



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁴ : C07K 15/00, A61K 39/12 C12P 21/00, A61K 39/42 G01N 33/569, C12N 15/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 87/ 01375 (43) Date de publication internationale: 12 mars 1987 (12.03.87)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR86/00288 (22) Date de dépôt international: 22 août 1986 (22.08.86) (31) Numéro de la demande prioritaire: 85/12750 (32) Date de priorité: 26 août 1985 (26.08.85) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr. Roux, F-75015 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : KOMLY, Carol, Ann [FR/FR]; 6, rue Copreau, F-75015 Paris (FR). CROISSANT, Odile [FR/FR]; 19, rue A. Lançon, F-75013 Paris (FR). BREITBURD, Françoise [FR/FR]; 36, rue Molitor, F-75016 Paris (FR).		(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; S.C. Ernest Gutmann - Yves Plasseraud, 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK, FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: POLYPEPTIDES AND ANTIBODIES CHARACTERISTIC OF THE PAPILLOMAVIRUS, METHODS OF DIAGNOSIS AND VACCINES IN WHICH THEY ARE USED (54) Titre: POLYPEPTIDES ET ANTICORPS CARACTERISTIQUES DU PAPILLOMAVIRUS, METHODES DE DIAGNOSTIC ET VACCINS LES UTILISANT (57) Abstract Papillomavirus polypeptides and/or antibodies against said polypeptides, particularly usable for the diagnosis or prevention or treatment of infections caused by distinct papillomaviruses which are respectively correlatable to likewise distinct affections or potentialities of affections. Said polypeptides are derived from L2 genes of different papillomaviruses (or from a portion of the reading frames open to said genes). The invention relates particularly to kits containing said antibodies, or distinct groups of antibodies, as well as to a method for the detection and identification of papillomaviruses in biological samples by immunological reaction with said antibodies, with a view to giving a diagnosis of the nature of affection affecting the donor subject of the biological sample, or affections to which the subject risks being exposed. (57) Abrégé Polypeptides de papillomavirus et/ou anticorps contre ces polypeptides, particulièrement utilisables pour le diagnostic ou la prévention ou le traitement des infections causées par des papillomavirus distincts respectivement corrélables à des affections ou des potentialités d'affections également distinctes. Ces polypeptides sont dérivés des gènes L2 de différents papillomavirus (ou d'une partie des cadres de lecture ouverte de ces gènes). Elle concerne en particulier des nécessaires ou "kits" contenant ces anticorps, ou des groupes distincts d'anticorps, ainsi qu'un procédé de détection et d'identification de papillomavirus dans des échantillons biologiques par réaction immunologique avec lesdits anticorps, en vue du diagnostic de la nature de l'affection dont souffre le sujet donneur de l'échantillon biologique, ou des affections auxquelles il risque d'être exposé.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GA	Gabon	MR	Mauritanie
AU	Australie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BB	Barbade	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	IT	Italie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	ML	Mali		
FR	France				

1

Polypeptides et anticorps caractéristiques du papillomavirus, méthodes de diagnostic et vaccins les utilisant.

L'invention concerne des ADNs de papillomavirus, et plus particulièrement des sondes dérivées de ces papillomavirus, ainsi que des procédés les mettant en oeuvre pour le diagnostic in vitro d'infections à papillomavirus.

L'expression "papillomavirus" recouvre un grand nombre de virus ayant en commun d'être tenus pour responsables de plusieurs formes d'infections virales s'étageant entre les verrues cutanées ou de muqueuses relativement bénignes et des hyperplasies susceptibles de dégénérer en néoplasies intra-épithéliales et cancers cutanés. Parmi des infections à papillomavirus, on mentionnera également plus particulièrement les épidermodysplasies verruciformes, qui seront quelquefois ci-après désignées sous l'expression "EV".

Un certain nombre de types de papillomavirus a déjà été décrit. Dans le cadre de la présente demande de brevet seront décrits de nombreux types et sous-types nouveaux de papillomavirus qui ont été isolés à partir de verrues ou lésions maculaires disséminées, susceptibles de donner lieu au développement précoce de cancers de la peau chez d'importantes proportions des malades qui en seront affectés.

Des études récentes ont révélé l'importance de facteurs immunitaires et le rôle majeur de divers types de virus de papillomes humains (HPV), ces facteurs s'ajoutant au rôle déjà décrit dans la littérature de facteurs génétiques divers et des rayonnements actiniques dans la pathogénèse des infections aux papillomavirus.

L'invention découle des observations qui ont pu être faites quant aux comportements relatifs d'un grand nombre de papillomavirus nouvellement isolés, dont les caractéristiques génomiques essentielles seront définies ci-après.

L'étude d'un petit nombre de cas d'EV avait déjà

conduit à la caractérisation de six types d'HPV après clonage moléculaire de leurs génomes (KREMSDORF, D. et al, 1982, J. Virol. 43:436-447 et KREMSDORF et al, 1983, J. Virol. 48:340-351). Ces HPV ont été divisés en trois groupes en fonction de l'absence d'hybridation croisée ou d'une hybridation croisée très faible entre les génomes appartenant à des groupes différents. Le premier groupe comprenait les HPV3a et 10 qui sont associés aux verrues planes observées chez certains malades atteints d'EV et dans la population générale ; des séquences d'ADN apparentées à celles de l'HPV3a ont été trouvées dans un cancer de malade atteint d'EV. Le second groupe comprenait les HPV5, 8 et 12, les génomes des HPV5 et 8 ayant été détectés dans des cancers de malades atteints d'EV. Le troisième, groupe est constitué à ce jour d'un seul virus, l'HPV9. A l'exception d'un receveur d'une allogreffe rénale présentant une immunosuppression, qui s'était révélé être infecté par l'HPV5, les virus des deux derniers groupes n'avaient été détectés que chez des malades atteints d'EV, la plupart d'entre eux étant infectés par plusieurs virus. Il faut noter que parmi les 14 types d'HPV actuellement mentionnés dans la littérature (références bibliographiques 1-5, 8, 9, 13, 14, 16, 18-20 indiquées plus loin), quatre se sont révélés associés spécifiquement à l'EV qui est une maladie rare.

Les travaux qui ont conduit à l'invention et qui ont permis d'isoler un nombre important de nouveaux types et sous-types de papillomavirus permettent désormais d'envisager des techniques de diagnostic *in vitro* plus affinées. Plus particulièrement, l'invention fournit des techniques perfectionnées d'identification de papillomavirus, par exemple obtenus à partir de lésions ou de coupes de biopsies et permet de faire des diagnostics plus précis, dont pourront également résulter des pronostics améliorés quant à l'évolution possible des lésions en cause.

D'une façon générale, il sera remarqué que les papillomavirus, bien que très différents entre eux, ont des tailles de l'ordre de 7000-8000 paires de bases. En outre leurs génomes peuvent néanmoins présenter certains degrés d'homologie. Dans ce qui suit, on fera référence à des évaluations des pourcentages d'homologies entre types et sous-types de papillomavirus, ces pourcentages d'homologies résultant d'essais d'hybridation réalisés dans des conditions dites non stringentes ou non strictes ou encore dans des conditions d'hybridation stringente ou stricte.

Parmi les papillomavirus, on distinguera plusieurs types de papillomavirus, ceux-ci se distinguent par leurs pourcentages d'homologies mesurés dans des conditions strictes ou stringentes. Il sera dit que les papillomavirus qui, dans ces dernières conditions, présentent des pourcentages d'homologie inférieurs à 50 % appartiennent à des types différents. On notera à cet égard que les pourcentages d'homologie entre des virus de types différents peuvent même tomber à zéro dans lesdites conditions strictes ou stringentes. Les virus pour lesquels on observe, dans ces conditions strictes ou stringentes, des pourcentages d'homologie supérieurs à 50 % sont considérés comme appartenant au même type et former des sous-types différents au sein de ce même type.

Les essais d'hybridation dans les conditions non strictes ou non stringentes impliquent la mise en contact mutuelle d'ADNs provenant de deux isolats de virus dans les conditions suivantes décrites par HEILMAN C.A. et al, 1980, J. Virol., 36, 395-407, et CROISSANT et al, 1982, C.R. Acad. Sc. Paris, 294, 581-586 (molécules hétéroduplexes).

Les essais d'hybridation dans les conditions strictes ou stringentes impliquent la mise en contact mutuelle d'ADNs provenant de deux isolats de virus dans les conditions décrites par KREMSDORF, D. et al. ((1982), J. Virol. 41:436-447 et 1983, J. Virol. 48:340-351) et

DAVIS R.W. et al., 1971, Methods Enzymol., 21, 413-428 (molécules hétéroduplexes).

Schématiquement, on remarquera que les papillomavirus appartenant à un même type présentent des séquences hybridables ayant des séquences nucléotidiques sensiblement identiques sur 80 à 100 % de la totalité de leurs longueurs respectives, ces séquences homologues peuvent être réduites à 60 %, voire moins chez des papillomavirus de types différents. Le degré d'identité ou d'analogie des séquences de papillomavirus de types différents qui s'hybrident mutuellement dans des conditions non strictes ou non stringentes, peut évidemment être plus faible que dans le cas de papillomavirus appartenant au même type.

L'étude à laquelle les inventeurs ont procédé a montré à la fois que le degré d'hétérogénéité génétique entre papillomavirus de divers types était plus important que ce qui était apprécié auparavant et en même temps que les différents types se trouvaient souvent associés à des formes ou variantes d'infections présentant un certain degré de spécificité.

L'invention concerne par conséquent non seulement les ADNs susceptibles d'être isolés à partir des différents papillomavirus nouveaux qui ont été isolés et les sondes qui peuvent être constituées de tout ou partie de ces ADNs, mais encore des mélanges ou "cocktails" de types de papillomavirus susceptibles d'être mis en oeuvre plus efficacement pour le diagnostic de diverses catégories d'infection, voire des niveaux de risques qu'accompagnent la découverte chez un patient de papillomavirus déterminés. Le nombre des sondes à papillomavirus décrites dans la présente demande, auxquelles s'ajoutent, le cas échéant, celles constituées à partir des ADNs génomiques de papillomavirus déjà isolés précédemment et leurs associations dans des mélanges déterminés, permettrait donc la réalisation de diagnostics plus affinés, notamment une plus grande discrimination des diverses catégories

d'infections imputables aux divers types de papillomavirus ou susceptibles de se développer sous l'effet de ces derniers types et, au sein d'une catégorie d'infections déterminées, de mieux pronostiquer le degré de risque que ces dernières se transforment en des maladies plus redoutables. Par exemple l'invention a pour but de fournir des moyens permettant, dans le cas des infections se manifestant par des épidermodysplasies verruciformes, de mieux apprécier le degré de risque que ces dernières évoluent vers des cancers cutanés.

D'une façon générale et dans le but de simplifier l'exposé qui suit, les génomes entiers des papillomavirus seront désignés par l'abréviation "ADN-HPV".

Dans le même but de simplification, il est fait référence dans ce qui suit aux dessins, dans lesquels les figures consistent en des cartes physiques de restriction d'ADN-HPVs, parmi lesquelles d'ailleurs des ADN-HPVs de papillomavirus déjà connus.

Les cartes physiques donnent la position de sites de coupure par diverses endonucléases de restriction. L'origine des cartes est généralement constituée par un site unique de coupure. Les distances à l'origine sont exprimées en pourcentage de longueur de génome. Une unité de carte représente 1 % de longueur de génome.

L'invention concerne tout d'abord plus spécifiquement chacun des ADN-HPVs choisis parmi l'ensemble des ADNs qui présentent des tailles qui s'étagent entre 7000 et 8000 paires de bases et sont caractérisés par les cartes de restriction qui apparaissent dans les dessins en ce qui concerne plus particulièrement les ADN-HPVs obtenus à partir des papillomavirus et qui répondent aux désignations HPV-2d, HPV-10b, HPV-14a, HPV-14b, HPV-15, HPV-17a, HPV-17b, HPV-19, HPV-20, HPV-21, HPV-22, HPV-23, HPV-24, HPV-28, HPV-29, HPV-31 et HPV-32, HPV-IP2 et HPV-IP4.

Il va de soi que l'invention étend également ses effets aux ADN-HPVs qui peuvent être considérés comme

appartenant aux mêmes types que ceux qui viennent d'être énoncés.

Les cartes physiques correspondant aux ADN-HPVs des virus nouvellement caractérisés sont indiquées par un 5 cercle noir.

L'invention concerne également des fragments des ADN HPV's précédents ou capables de s'hybrider avec ceux-ci, notamment dans des conditions strictes. De même, elle concerne les ADN's recombinants contenant tout ou partie de 10 chacun des ADN-HPV's sus-indiqués, et plus particulièrement des ADN's recombinants contenant des fragments correspondant aux gènes E1, E6-E7, L1 et L2 respectivement ou encore des fragments contenant des séquences correspondant aux régions intergéniques desdits ADN-HPV's. Elle concerne 15 enfin les sondes qui peuvent être constituées à partir de ces ADN-HPV's respectifs ou à partir des fragments correspondants et les procédés de diagnostic *in vitro* mettant en jeu lesdites sondes.

Les préparations d'ADN viral ont été extraites sélectivement (LUTZNER, M.A. et al., 1983, Lancet ii:422- 20 424) à partir de produits de grattage de lésions bénignes de six malades européens atteints d'EV et de deux malades sud-américains atteints d'EV. Les ADN's d'HPV ont été purifiés par centrifugation en équilibre dans des gradients 25 de chlorure de césium et/ou sédimentation dans des gradients de saccharose en présence de bromure d'éthidium, selon des modes opératoires précédemment décrits (articles de KREMSDORF, D. et al. déjà décrits et ORTH, G. et al., 1980, Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation 30 7:259-282). Les préparations d'ADN ont été traitées avec des endonucléases de restriction et les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse sur des gels d'agarose (articles de KREMSDORF et al. déjà mentionnés). En plus des HPV5, 8 et 12 (articles de KREMSDORF et al. 35 déjà mentionnés) et de l'HPV2 (HEILMAN, C.A. et al., 1980, J. Virol. 36:395-407 et ORTH, G. et al., 1980, Cold Spring

Harbor Conf. Cell Proliferation 7: 259-282) trouvés dans les verrues vulgaires d'un des malades, ont été identifiés onze souches fournissant des modèles majeurs de clivage par des enzymes de restriction d'ADN, différents de ceux des types précédemment caractérisés. Les nouveaux types d'HPV ont reçu un numéro et les sous-types d'un type ont reçu le même numéro suivi d'une lettre, selon l'ordre chronologique de leur identification (COGGIN, J.R. et al., Cancer Res. 39:545-546). Les génomes des 11 nouveaux HPVs ont été clonés dans Escherichia coli K12, souche C600 (article de KREMSDORF, D. et al. (1983) déjà mentionné). Les ADNs ont été insérés sous forme de molécules de longueur unitaire à l'exception de deux fragments d'ADN d'HPV24 produits par l'endonucléase BamHI. Ils ont été insérés soit dans le plasmide pBR322 (SUTCLIFFE, J.G., 1978, Nucleic Acids Res. 5:2721-2728), en utilisant les sites de clivage uniques de AvaI, de BamHI et de HindIII, soit dans un plasmide recombinant ayant intégré le fragment HindIII B de l'ADN d'HPV5 (article de KREMSDORF, D. et al., 1982, déjà mentionné), qui contient un site SacI unique. Plus particulièrement les HPV17b et 22 ont été insérés sous forme de molécules d'ADN de longueur unitaire après clivage avec une enzyme (SacI) qui ne clive qu'une fois l'ADN d'HPV et le plasmide recombinant pBR322 contenant le fragment HindIII B de l'ADN d'HPV5. L'ADN d'HPV14a a été inséré dans le plasmide pBR322 sous forme d'une molécule d'ADN de longueur unitaire après digestion incomplète de la préparation d'ADN viral avec HindIII, une enzyme qui produit deux fragments de 96,1 et 3,9 % de la longueur du génome. Les fragments BamHI A et B d'HPV24 (ayant des tailles correspondant à respectivement 83,1 et 16,9 % de la longueur du génome) ont été insérés séparément dans le plasmide pBR322.

Les clones isolés et les sources des HPV correspondants résultent du tableau I ci-après :

TABLEAU 1. ORIGINE DES ADNs d'HPV CLONES

Malade ^a	Nationalité	Source ^b	Type d'ADN d'HPV		Enzyme ^c de clonage	Autres types d'HPV trouvés chez les malades
			cloné			
1	Polonaise	verrues ; genoux	14a		Hind III	5
2	Française	verrues ; mains	15		Bam HI	
3	Colombienne	macules ; mains	14b		Bam HI	
4	Italienne	macules ; tronc	17a		Bam HI	5
		macules ; poitrine	17b		Sao I	5
5	hollandaise	macules ; dos	22		Sao I	
		macules ; poitrine	19		Bam HI	5,8,17a
6	Colombienne	verrues ; mains	24		Bam HI	
7	Polonaise	verrues ; genoux	20		Ava I	5,8,24
8	Polonaise	macules ; avant-bras	21		Bam HI	2,12,17a,20
			23		Bam HI	5,8,20

Pour identifier les plasmides recombinants, les mobilités électrophorétiques des produits de digestion des ADN_s recombinants et des ADN_s d'HPV non clonés ont été comparées après traitement avec un mélange de deux endonu-
5 cléases de restriction comprenant l'endonucléase utilisée pour l'insertion des séquences virales dans le plasmide. Le nombre et la taille des fragments isolés ont indiqué que dans chaque cas les génomes viraux entiers ont été intégrés. Une hétérogénéité des tailles des ADN_s a été
10 observée lorsque les ADN_s des HPV_s, non clonés ou excisés des séquences plasmidiques, ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (données non présentées). Les ADN_s d'HPV14b, 19, 20 et 21 ont des tailles semblables à ceux des HPV3a, 5, 8 et 12 (environ 7700 paires de nuclé-
15 otides (articles de KREMSDORF, D. déjà mentionnés), tandis que les ADN_s d'HPV15, 17a, 17b, 22 et 23 ont des tailles plus faibles semblables à celle d'HPV9 (environ 7200 paires de nucléotides) (articles de KREMSDORF, D., 1982) et ORTH, G., 1980, déjà mentionnés).

20 La sensibilité des génomes viraux clonés à 14 endonucléases de restriction a été analysée et les cartes physiques ont été établies (figures 1 à 10). Les cartes de restriction de certains des ADN-HPV_s sont répétées dans certaines des figures pour les motifs exposés plus loin.
25 Entre 22 et 33 sites de clivage ont été localisés selon les méthodes précédemment décrites (9). Aucune analogie évidente n'a été détectée entre ces cartes, à l'exception de celles des HPV14a et 14b, d'une part (figs.4a et 4b) et entre celles des HPV17a et 17b, d'autre part (figure 5).
30 Parmi les 21 et 31 sites localisés respectivement sur les ADN_s des HPV14a et 14b, 15 se sont révélés communs lorsque l'un des deux sites de clivage BamHI de l'ADN d'HPV14a a été aligné avec le site de clivage BamHI unique de l'ADN d'HPV14b. De façon semblable, 21 des 29 sites de clivage
35 situés sur l'ADN d'HPV17a ont également été trouvés sur l'ADN d'HPV17b (avec 26 sites), lorsque les sites de

clivage BamHI uniques ont été alignés.

Aucune analogie évidente n'a été détectée entre ces cartes et celles précédemment établies pour les HPV associés à l'EV (HPV3a, 5, 8, 9, 10 et 12) (8,9, 16, 18, 20),
5 aux verrues cutanées (HPV1, 2, 4 et 7), et aux lésions des membranes mucocutanées ou muqueuses (HPV6b, 11a, 13 et 16) (1, 33, 19), à l'exception de la carte d'HPV14a qui est étroitement apparentée à la carte d'un HPV isolé d'un malade japonais atteint d'EV (24). Ce dernier isolat diffère
10 de l'HPV14a par un site BamHI et un site HindII additionnels, alors que les localisations des sites Aval, BamHI, BglI, EcoRI, HindII et HindIII sont semblables dans les deux virus. Des expériences d'hybridation croisée ont confirmé que ces deux virus étaient très étroitement appa-
15 rentés.

On remarquera encore que quelques sites (ceux indiqués par les flèches) n'ont pas été localisés. Les sites de clivage différant de moins de 2 % de la longueur du génome par leur localisation sont considérés comme con-
20 servés (*). Les enzymes ne produisant pas de coupure ont été PvuI, Sal I et SmaI pour les ADNs d'HPV14a et 23 ; PvuI, SacI, SalI et SmaI pour l'ADN d'HPV14b ; BglI, PvuI, SalI et SmaI pour les ADNs d'HPV15, 17a et 17b ; BglI, SacI, SalI et SmaI pour l'ADN de HPV19 ; EcoRI, PvuI, SacI
25 et SmaI pour l'ADN d'HPV20 ; Sac I et SmaI pour l'ADN d'HPV21 ; BamHI, BglI, PvuI, PvuII et SalI pour l'ADN d'HPV22 ; BglI, EcoRI, PvuI, SacI, SalI et SmaI pour l'ADN d'HPV24.

L'existence d'homologies de séquence entre les ADNs
30 des ADNs d'HPV nouvellement caractérisés ainsi qu'entre ces derniers et les ADNs d'HPV d'EV précédemment caractérisés (HPV3a, 5, 8, 9, 10 et 12) d'HPV associés aux verrues cutanées (HPV1, 2, 4 et 7), et d'HPV associés à des lésions des membranes muqueuses (HPV6b, 11a, 13 et 16)
35 a été étudiée. Des expériences d'hybridation par fixation sur un papier-filtre et d'hybridation ADN-ADN en phase

liquide à saturation suivie d'une digestion par la nucléase S1 ont été effectuées dans des conditions strictes ou stringentes précédemment décrites (8, 9). En particulier les ADN_s d'HPV ont été marqués par translation de 5 coupure ("nick-translation") et fractionnés par sédimentation dans des gradients de saccharose alcalins (5 à 20 %) comme précédemment décrit (13). Les ADN_s d'HPV marqués (4000 cpm) ont été incubés dans du NaCl 0,48 M-EDTA 1 mM (pH 6,8) à 68°C, en présence soit d'ADN de thymus de veau 10 (20 µg), soit d'ADN d'HPV non marqué (0,20 µg) comme précédemment décrit (8, 9). Les activités spécifiques des sondes d'ADN d'HPV ont varié entre $5,3 \times 10^7$ et 2×10^8 cpm/µg. Le pourcentage d'hybridation a été déterminé par mesure des fractions résistant à la nucléase S1. Les 15 nombres représentent les valeurs corrigées pour l'auto-renaturation spontanée des sondes (4 à 15 %) et normalisées à 100 % pour l'hybridation homologue (75 à 95 %). L'abréviation ND signifie : non déterminé. Les importances relatives des hybridations croisées entre les ADN-HPV dans 20 les conditions sus-indiquées sont exprimées en % d'hybridation entre un ADN HPV marqué et un ADN HPV non marqué.

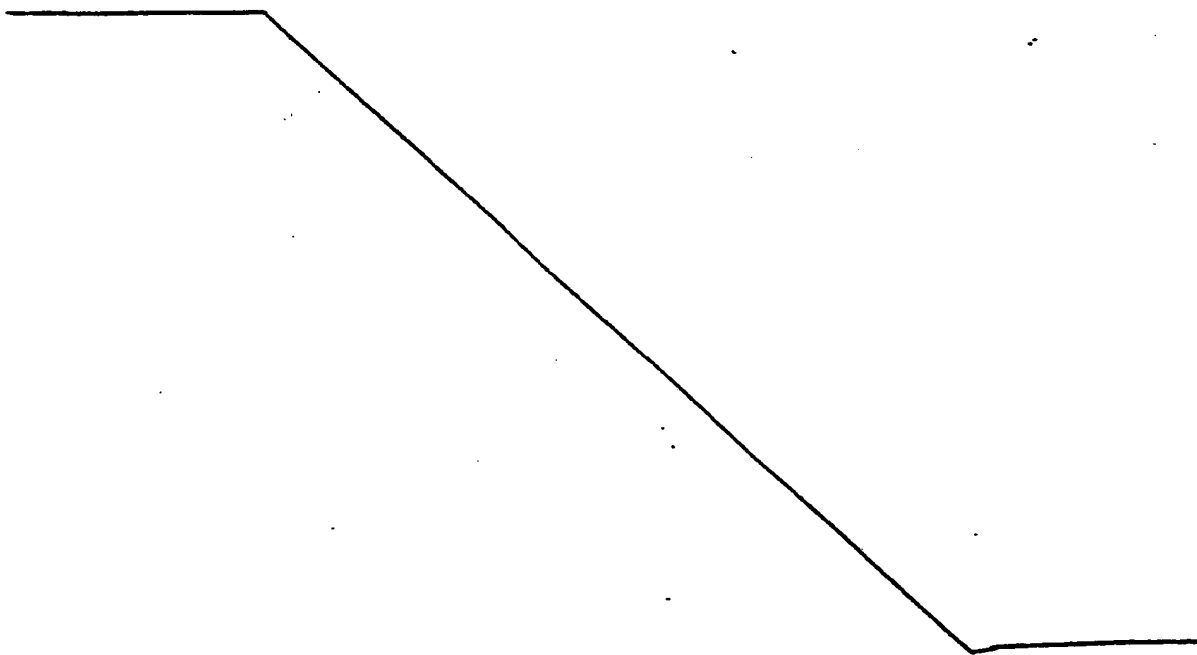


TABLEAU 2. DEGRE D'HYBRIDATION CROISEE ENTRE LES ADN^s d'HPV DETERMINEE PAR HYBRIDATION EN PHASE LIQUIDE

ADN d'HPV		% d'hybridation avec de l'ADN d'HPV marqué au ³² P													
non marqué	3a	5	14a	14b	19	20	21	22	23	9	15	17a	17b	24	
1a	0,1	0,3	0,2	0,3	0	0,8	2,9	0	0	1,0	0,4	0,2	0	0	
11a	1,6	1,0	1,3	0	0,3	0,1	0,7	3,7	0	0,1	0,1	0,6	3,3	0	
3a	100	1,8	1,0	0	1,5	0,1	1,5	0	1,9	0,1	1,7	1,2	1,8	3,0	
10	32,3	ND	ND	0,1	0	0,1	1,9	3,0	ND	0	1,6	0,1	2,0	ND	
5	0,2	100	12,1	12,4	5,8	9,3	9,4	10,1	5,8	4,3	0,7	3,6	0	2,4	
8	1,1	15,7	9,9	13,4	0,5	5,6	5,0	7,1	5,8	3,5	1,5	3,2	3,8	0,1	
12	0,1	19,3	9,2	12,5	5,3	8,6	9,3	11,7	4,0	3,6	1,2	0,1	1,9	0	
14a	0,2	13,2	100	88,8	14,6	32,4	32,9	10,1	24,6	3,0	2,2	2,4	4,1	ND	
14b	ND	10,5	94,1	100	9,3	28,4	35,4	9,5	28,2	0	0	0	0	0	
19	ND	7,2	21,4	20,6	100	7,6	8,8	15,5	27,7	0	0	0	2,2	1,0	
20	ND	9,9	28,8	37,9	6,2	100	25,4	13,7	14,1	0	0	2,1	0	3,6	
21	ND	10,5	38,7	40,5	6,4	37,5	100	9,8	18,6	0,1	0	2,5	0,3	0	
22	ND	7,2	7,4	ND	17,3	7,2	10,8	100	17,9	0	0	0,1	0,1	0	
23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21,2	100	0	0,5	0	0	0,1	
9	0,4	3,1	0,5	1,2	0	2,0	1,0	0	0	100	5,5	6,3	5,4	0	
15	0,4	3,3	2,1	3,3	0	0,1	0,8	0	0	7,8	100	22,5	21,6	0	
17a	0,7	1,2	1,4	2,8	0	0,1	0,1	0,8	1,4	7,6	19,5	100	92,7	0	
17b	ND	ND	ND	1,4	0	0,3	3,4	ND	ND	ND	ND	86,3	100	ND	
24	ND	ND	0,1	2,6	ND	ND	ND	0,8	0	0,2	0	1,1	1,1	100	

On constate l'absence ou la quasi-absence d'hybridation croisée entre les génomes des HPV1, 2, 4, 6b, 7 et 11a et d'ADNs d'HPV d'EV nouvellement clonés marqués au ^{32}P ou entre les ADNs d'HPV d'EV non marqués et des sondes spécifiques des HPV13, 16 et 18. De façon semblable, on n'a pas ou quasiment pas détecté d'hybridation croisée entre les ADNs des HPV14a, 14b, 15, 17a, 17b, 19, 20, 21, 22, 23 et 24 et les ADNs des HPV1a et 11a par réassociation à saturation (tableau 2). Les ADNs d'HPV nouvellement clonés n'ont pas ou quasiment pas présenté d'hybridation croisée ou ont présenté une hybridation croisée inférieure à 50 % entre eux et avec les génomes des autres HPV associés à l'EV (HPV3a, 5, 8, 9, 10 et 12), à l'exception des HPV14a et 14b, d'une part, et des HPV17a et 17b, d'autre part, qui ont présenté une forte hybridation croisée. Ces observations justifient le classement des nouveaux virus en neuf nouveaux types (HPV14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23 et 24) plus deux sous-types des types 14 (HPV14a et b) et 17 (HPV17a et b).

De même les différents HPVs ont été classés en groupes, sur la base de leurs homologues (ou absence d'homologues) de séquences dans des conditions strictes d'hybridation moléculaire. Ces groupes, désignés par les lettres A à H, sont répertoriés dans le tableau III qui suit. Ce tableau mentionne les maladies qui ont été diagnostiquées chez les porteurs de ces HPVs (isolés ou en combinaison entre eux) et les potentiels oncogènes qui leur ont été reconnus.

TABLEAU III

CLASSIFICATION DES HPV FAISANT L'OBJET DE LA DEMANDE DE BREVET, EN FONCTION DE LEUR DEGRE D'ONCOLOGIE DE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DETERMINEE PAR HYBRIDATION MOLECULAIRE DANS DES CONDITIONS STRICTES

Groupe ¹⁾	Types ²⁾ d'HPV	Homologies au sein du groupe	Maladies associées	Potentiel oncogène	Mélange de sondes
A	1		Myrcémies	très faible	1
B	2		Verrues vulgaires	faible	1
C	3, 10, 28*, 29*	14 à 30 %	Verrues planes Verrues intermédiaires Kératoses séniles Maladie de Bowen	mixtifié; un virus apparenté, associé à des néoplasies intraépithéliales et des cancers cutanés, en cours de caractérisation	2
D	4		Verrues vulgaires	très faible	1
E	5, 8, 12, 14*, 19*, 20*, 21*, 22*, 23*	4 à 38 %	Epidermoxypsoplasie verruciforme Kératoses séniles ou actiniques Maladie de Bowen Carcinomes cutanés	HPV5, 8 et 14 associés aux carcinomes d'HPV; un virus apparenté, associé à des néoplasies intraépithéliales et des cancers cutanés, en cours de caractérisation	3, 4, 7
F	9, 15*, 17*	6 à 23 %	Epidermoxypsoplasie verruciforme		5
G	24*		Epidermoxypsoplasie verruciforme		6
H	13, 31*		Hyperplasie épithéliale focale orale, leucoplasies orales		8
I	32*		Maladie de Bowen	Néoplasies intraépithéliales cutanées	7, 9

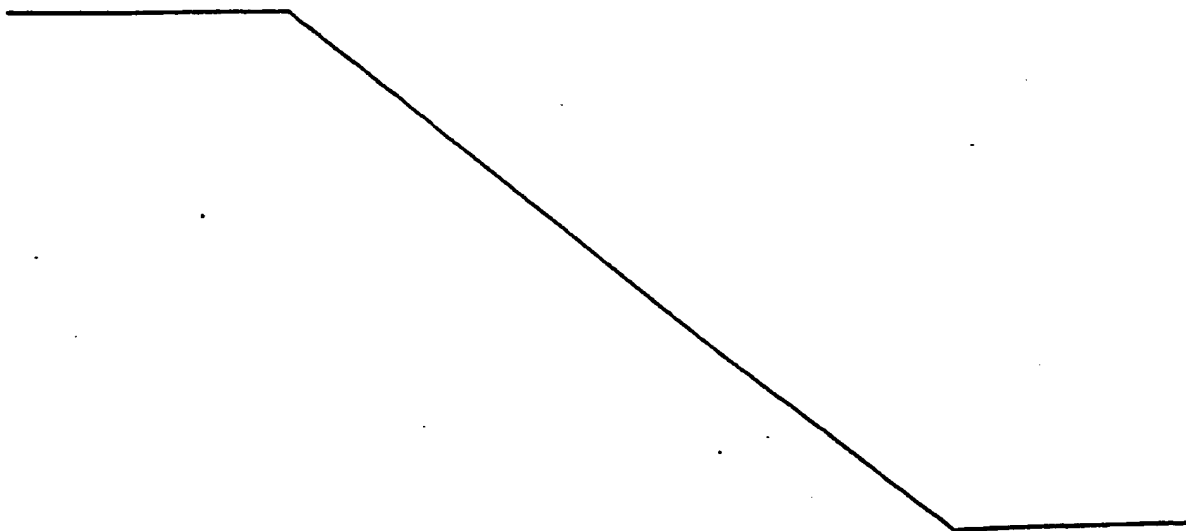
1) Les génomes des types d'HPV appartenant à des groupes différents ne présentent généralement pas d'homologie de séquence décelable dans des conditions strictes d'hybridation moléculaire. Les génomes des types d'HPV appartenant au même groupe présentent une homologie de séquence inférieure à 50 %.

2) Les nouveaux types d'HPV sont listés par un astérisque.

Les ADNs des HPV5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 22 et 23 présentent entre eux des taux d'hybridation croisée (homologies de groupes) variant de 5 à 38 %, et ne présentent une hybridation croisée notable (4 à 13 %) qu'avec les
5 ADNs des HPV5,, 8 et 12. Ces virus font donc partie d'un groupe d'HPV d'EV précédemment défini (9).

De même les ADNs des HPV9, 15 et 17 qui présentent entre eux une hybridation croisée d'environ 20 % et une hybridation croisée d'environ 6 % avec l'ADN d'HPV9, ap-
10 partiennent également à un groupe d'HPV d'EV déjà décrits (9). Les HPVs de types 13 et 31 peuvent être considérés comme appartenant à un même groupe. Enfin les HPVs de types 1, 2, 4, 24 et 32 qui ne présentent presque pas d'homologie avec les génomes des autres HPV sont
15 considérés comme formant les premiers membres d'autres groupes distincts entre eux et des groupes précédents.

L'invention concerne encore plus particulièrement des fragments d'ADN, issus des ADN-HPVs sus-décrits, et plus particulièrement ceux correspondant respectivement
20 aux gènes E6-E7 ; E1 ; L2 ; L1 et à leurs régions intergéniques. Les positions et longueurs relatives de ces divers fragments, vis-à-vis des sites pris comme origines (figures 1 à 9) sont indiquées dans le tableau IV qui suit.



LOCALISATION PUTATIVE DES PRINCIPAUX GENES ET DE LA REGION INTERGENIQUE SUR LES CARTES PHYSIQUES DES GENOMES
D'HPV

Type d'HPV	E6 - E7	Coordonnées des extrémités 5' et 3' des fragments correspondant aux gènes E1	L2.	L1	à la région intergénique
1	44 - 34,5	35 - 11	95 - 75,5	76,5 - 56	56 - 44,5
3	18,5 - 9	9,5 - 05,5	69,5 - 50	51 - 30,5	30,5 - 19
5	6,5 - 97	97,5 - 73,5	57,5 - 30	39 - 18,5	18,5 - 7
8	63 - 53,5	54 - 30	14 - 94,5	95,5 - 75	75 - 63,5
9	42 - 32,5	33 - 9	93 - 73,5	74,5 - 54	54 - 42,5
10a	49 - 39,5	40 - 16	0 - 80,5	81,5 - 61	61 - 49,5
10b	93 - 83,5	84 - 60	44 - 24,5	25,5 - 5	5 - 93,5
12	23,5 - 14	14,5 - 90,5	74,5 - 55	56 - 35,5	35,5 - 24
14	8,5 - 99	99,5 - 75,5	59,5 - 40	41 - 20,5	20,5 - 9
15	39,5 - 30	30,5 - 6,5	90,5 - 71	72 - 51,5	51,5 - 40
17	46 - 36,5	37 - 13	97 - 77,5	78,5 - 58	58 - 46,5
24	24,5 - 15	15,5 - 91,5	75,5 - 56	57 - 36,5	36,5 - 25
28	47,5 - 38	38,5 - 14,5	98,5 - 79	80 - 59,5	59,5 - 48
29	89,5 - 80	80,5 - 56,5	40,5 - 21	22 - 1,5	1,5 - 90
31	89 - 70,5	80 - 53,5	33,5 - 15,5	17,5 - 96,5	96,5 - 92,5

La localisation des gènes sur le génome du HPV1 a été déduite de la séquence nucléotidique de ce génome (Brevet O. Danos, M. Katinka et M. Yaniv). Les cartes physiques des génomes des HPV3, 5, 8, 9, 10a, 12, 14, 15, 17 et 24 ont été alignées par rapport à la carte physique et à la carte génétique du HPV1, et celle du HPV31, par rapport à la carte physique et à la carte génétique du HPV6b (E. Schwarz et al, EMBO J., 1983, 2, 2341-2348), après analyse au microscope électronique de molécules hétéroduplexes formées dans des conditions strictes (T_m -29°C) ou moins strictes (T_m -40°C) d'hybridation. Les cartes physiques des HPV10b, 28 et 29 ont été alignées par rapport aux cartes physiques des HPV3a et 10a après juxtaposition des sites d'enzymes de restriction conservés.

Les valeurs des coordonnées portées dans le Tableau IV indiquent la position, sur les cartes physiques présentées dans les figs. 1-9, des extrémités 5' et 3' des segments des génomes homologues des gènes E6 et E7, E1, L2 et L1 et de la région intergénique par rapport au génome du HPV1a ou, dans le cas du HPV31, par rapport au génome du HPV6b.

La région intergénique (comportant des éléments de régulation) et les gènes adjacents E6 et E7 (correspondant vraisemblablement aux gènes de transformation majeurs exprimés dans les tumeurs) ne présentent pas d'homologie de séquence décelable par analyse au microscope électronique de molécules hétéroduplexes formées, dans des conditions non strictes d'hybridation, entre des génomes de types d'HPV appartenant à des groupes différents, ou formées, dans des conditions strictes d'hybridation, entre les génomes de la plupart des types d'HPV appartenant au même groupe. Le gène E1 (impliqué principalement dans la répllication de l'ADN viral) et le gène L1 (codant pour la protéine majeure de la capsid virale portant les principaux déterminants antigéniques des virions) présentent des homologies de séquence décelables par analyse d'hétéro-

plex formés, dans des conditions non strictes d'hybridation, entre des génomes de types d'HPV appartenant à des groupes différents ou formés, dans des conditions strictes d'hybridation, entre des génomes d'HPV appartenant au même
5 groupe.

Des sondes préparées à partir de plasmides recombinants comportant les régions E1 et L1 peuvent théoriquement permettre de détecter le plus grand nombre de types d'HPV par des expériences d'hybridation moléculaire effectuées, selon le cas, dans des conditions strictes ou
10 non strictes. Des sondes préparées à partir de plasmides recombinants comprenant la région intergénique et les gènes E6 et E7 permettent de détecter spécifiquement un type d'HPV ou des types d'HPV apparentés.

15 La région L2 (codant pour un constituant mineur de la capside virale) présente un degré variable de conservation de séquences nucléotidiques parmi les différents types d'HPV.

Dans ce qui suit sont encore décrites de façon plus
20 précise les conditions dans lesquelles les virus HPV-IP2 et HPV-IP4 ont été isolés, puis les conditions dans lesquelles ont été obtenus les ADN-HPVs à partir de ces virus.

Clonage moléculaire et caractérisation d'un nouveau type
25 d'HPV associé à des néoplasies et à des cancers génitaux
(HPV IP2).

Un nouveau type d'HPV a été mis en évidence dans l'ADN extrait d'un cancer du col de l'utérus, par hybridation, dans des conditions non strictes, avec une sonde
30 radioactive spécifique du HPV type 16. Aucune hybridation croisée n'était détectable lorsque l'hybridation était effectuée dans des conditions strictes d'hybridation. Une étude de la sensibilité de l'ADN de cet HPV à plusieurs enzymes de restriction a montré que l'enzyme BglII coupait
35 une fois l'ADN viral. Après digestion de l'ADN extrait de la tumeur par l'endonucléase BglII, la fraction renfermant

des molécules d'ADN de 8kb (taille d'un génome de papillomavirus) ont été purifiés par centrifugation dans un gradient de saccharose. Les molécules de 8kb ont été insérées, par le site BglII, dans un vecteur constitué du plasmide PL15.5 (renfermant un site unique de coupure par BglII et par BamHI) inséré par son site BamHI, dans l'ADN du bactériophage lambda L47.1. Après encapsidation de l'ADN recombinant et infection de bactéries hôtes (*Escherichia coli*, souche LA101), les plages de lyse correspondant à des phages recombinants ont été détectées par hybridation de répliques des cultures bactériennes infectées, avec un ADN de HPV16 radioactif, dans des conditions non strictes. Plusieurs bactériophages recombinants, contenant la totalité des séquences virales, ont été isolés : la coupure de l'ADN phagique par l'enzyme d'insertion BglII engendre un fragment de 8kb hybridant avec la sonde HPV16 dans des conditions non strictes ; la coupure de l'ADN des phages recombinants et de l'ADN de la tumeur d'origine par mélange des enzymes BglII et PstI engendre les mêmes 5 fragments dans la somme des poids moléculaires est égale à la taille d'un génome des papillomavirus. L'ADN du nouvel HPV a été excisé de l'ADN des bactériophages recombinants, purifié par électroélution, et recloqué dans le plasmide PL15.5. Une carte de restriction de l'ADN viral a été établie à partir de la sensibilité de cet ADN à 18 endonucléases de restriction, ce qui a permis de localiser 21 sites de coupure (figure 9). La carte ainsi établie est différente de la carte des génomes des HPV identifiés à ce jour. L'homologie de séquence entre l'ADN du nouvel HPV et l'ADN des HPV identifiés à ce jour a été analysée par des expériences d'hybridation moléculaire sur réplique effectuées dans des conditions strictes. L'homologie détectée toujours été inférieure à 5 %, la plus grande homologie étant détectée avec le génome du HPV16. Le nouveau virus caractérisé à partir d'un cancer du col de l'utérus constitue donc un nouveau type d'HPV,

provisoirement dénommé HPVIP2.

L'analyse, au microscope électronique, de molécules hétéroduplexes formées, dans différentes conditions, entre l'ADN de HPVIP2 et l'ADN du HPV1 a permis d'aligner les 5 cartes physiques de ces 2 génomes et de définir la position théorique des différents gènes portés par l'ADN de l'HPVIP2.

LOCALISATION PUTATIVE DES PRINCIPAUX GENES ET DE LA REGION
- INTRAGENIQUE DU HPV-IP2 SUR LA CARTE DE CE GENOME

10	Coordonnées des extrémités	
	5'	3'
E6-E7	62	71,5
E1	71	95
E2	95,5	11,5
15 L2	11	30,5
L1	31,5	52
Région intergénique	52	63,5

L'utilisation de sondes radioactives préparées à partir de l'ADN de l'HPVIP2 purifié a permis de déterminer 20 le pouvoir pathogène de ces virus. L'ADN du HPVIP2 a été mis en évidence dans un cas de papules bowénoïdes des organes génitaux externes sur les 14 étudiés, dans 2 cancers invasifs du col de l'utérus sur les 51 étudiés et dans 1 cas de néoplasie intraépithéliale du col de l'utérus sur 25 les 28 étudiés. HPVIP2 constitue donc un type d'HPV à tropisme génital présentant un potentiel oncogène, dont la fréquence est un peu inférieure à celle du HPV18, et nettement inférieure à celle du HPV16. Il est nécessaire de 30 paration de sondes moléculaires, en vue du diagnostic ou du dépistage des types d'HPV constituant un risque pour le développement de néoplasies génitales et, en particulier, de cancers du col de l'utérus.

Clonage moléculaire et caractérisation d'un nouveau type d'HPV associé à des lésions précancéreuses de la peau (HPV IP4).

Un nouveau type d'HPV a été mis en évidence dans
5 l'ADN extrait d'une biopsie de kératose actinique, une
lésion précancéreuse cutanée, par hybridation moléculaire,
dans des conditions strictes, avec un mélange avec des
sondes radioactives spécifiques des HPV type 5, 8 et 14.
Aucune hybridation croisée n'a été détectée lorsque l'hy-
10 bridation a été effectuée des sondes spécifiques des types
1,2,3,7,10,13,16,18,28,IP1 (précédemment dénommé HPV31),
IP2, et IP3 (précédemment dénommé HPV32).

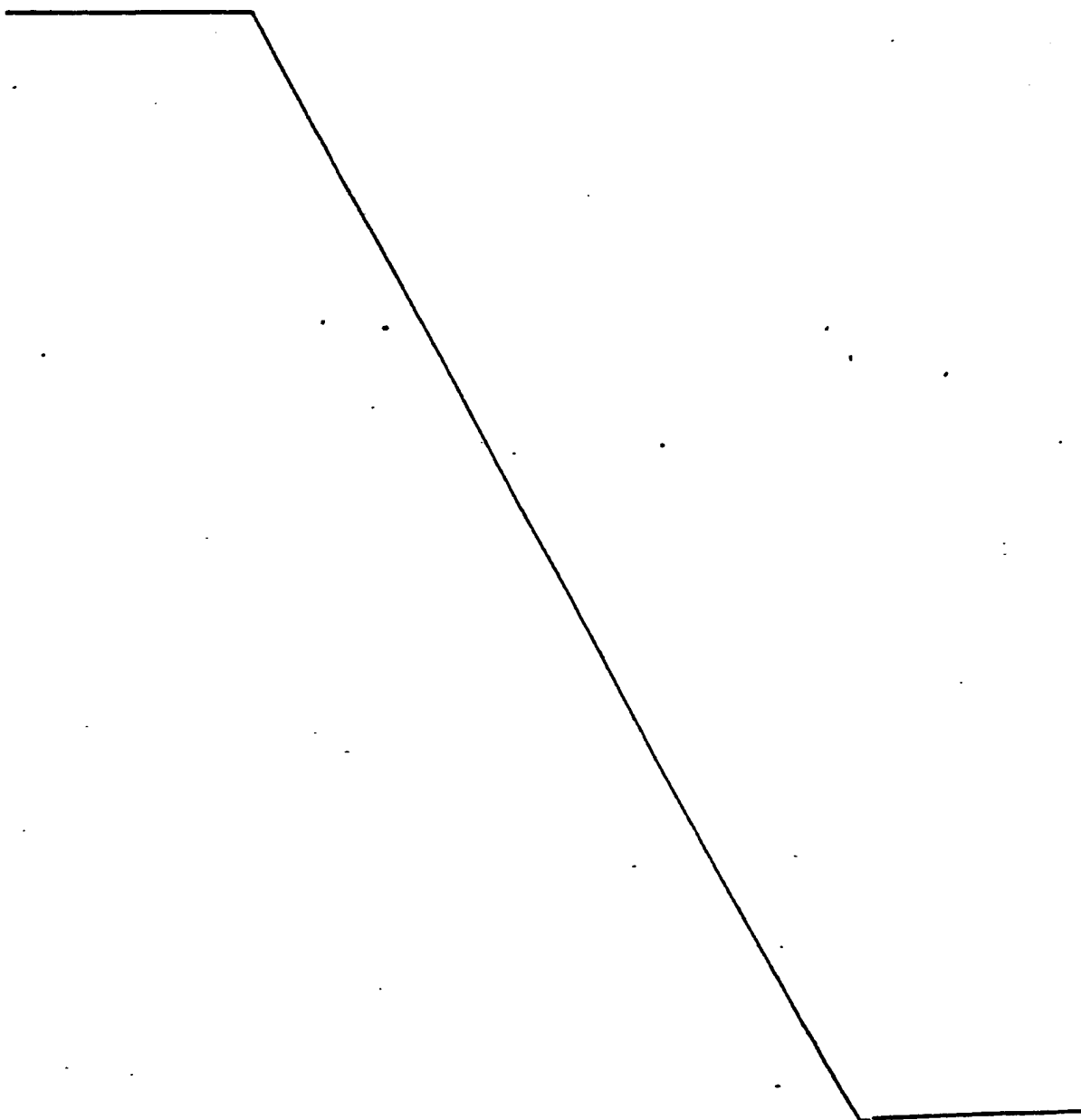
Une étude de la sensibilité de l'ADN de cet HPV a
plusieurs enzymes de restriction a montré que l'enzyme
15 EcoRI coupe une fois l'ADN viral. Après digestion de l'ADN
extrait de la biopsie par l'endonucléase EcoRI, la frac-
tion renfermant des molécules d'ADN de 8kb (taille d'un
génome de papillomavirus) a été purifiée par centrifuga-
tion dans un gradient de saccharose. Les molécules 8kb ont
20 été insérées, par le site EcoRI, dans l'ADN du bactérioph-
age λ gt 10. Après encapsidation de l'ADN recombi-
nant et infection de bactéries hôtes (*Escherichia coli*,
souche LA101), les plages de lyse correspondant à des
phages recombinants ont été détectées par hybridation de
25 répliques des cultures bactériennes infectées, avec un
mélange radioactif des ADN de HPVs, 8, et 14, dans des
conditions non strictes. Plusieurs bactériophages re-
combinants, contenant la totalité des séquences virales
ont été isolés : la coupure de l'ADN phagique par l'enzyme
30 d'insertion EcoRI engendre un fragment de 8kb hybridant
avec la sonde spécifique des HPVs, 8 et 14 dans des condi-
tions non strictes ; la coupure de l'ADN de phages recom-
binants et de l'ADN de la lésion d'origine par le mélange
des enzymes EcoRI et PstI engendre les mêmes 6 fragments
35 dont la somme des poids moléculaires est égale à la taille
d'un génome des papillomavirus. L'ADN du nouvel HPV a été

excisé de l'ADN d'un bactériophage recombinant, purifié par électroélution, et reclone dans le plasmide pSP65. Une carte de restriction de l'ADN viral a été établie à partir de la sensibilité de cet ADN à 15 endonucléases de restriction, ce qui a permis de localiser 23 sites de coupure (figure 10). La carte ainsi établie est différente de la carte des génomes des HPV identifiés à ce jour. L'homologie de séquence entre l'ADN du nouvel HPV et l'ADN des HPV identifiés à ce jour a été analysée par de expériences d'hybridation moléculaire sur réplique effectuées dans des conditions strictes. Une homologie, inférieure à 50 %, a été détectée entre l'ADN du nouvel HPV et l'ADN de certains types d'HPV précédemment identifiés dans des lésions d'épidermodysplasie verruciforme (HPV5,8,12,14,-19,20,21 et 25), mais aucune homologie n'a été détectée avec les autres types d'HPV. Le nouveau virus caractérisé à partir d'une kératose actinique constitue donc un nouveau type d'HPV provisoirement dénommé HPV-IP4.

L'utilisation d'une sonde radioactive préparée à partir de l'ADN de l'HPVIP4 purifié a permis de mettre en évidence HPVIP4 chez 42 % des 17 patients atteints d'épidermodysplasie verruciforme étudiés et dans x sur y des biopsies de kératose actinique analysées. Du fait de sa grande fréquence chez les malades atteints d'épidermodysplasie verruciforme, une maladie caractérisée par le développement fréquent de cancers cutanés, et de son association à une fraction des lésions de kératose actinique considérées comme précurseurs de cancers spinocellulaires de la peau, HPVIP4 constitue un type d'HPV à tropisme cutané présentant un potentiel oncogène. Il est nécessaire de l'incorporer à tout mélange d'ADN d'HPV destiné à la préparation de sondes moléculaires en vue du diagnostic ou du dépistage des types d'HPV constituant un risque pour le développement de lésions précancéreuses ou cancéreuses de la peau.

L'invention concerne plus particulièrement encore

des mélanges ou cocktails de différents ADNs HPVs (ou sondes contenant ces ADNs HPVs ou des séquences de ces derniers), susceptibles d'être utilisés en combinaison pour réaliser des diagnostics globaux des différentes
5 formes d'infections à papillomavirus, éventuellement aux fins de pronostiquer l'évolution possible de l'infection. Des mélanges préférés conformes à l'invention sont identifiés dans le tableau V qui suit.



TABEAU V
CARACTERISTIQUES DES MELANGES D'ADN D'HPV UTILISABLES POUR LE DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE
D'INFECTIONS A PAPILLOMAVIRUS

Désignation des mélanges	Constitution 1)	Maladies à diagnostiquer
1	1, 2d*, 4	Verrues cutanées ou muqueuses (en particulier, verrues vulgaires et plantaires). Diagnostic différentiel de l'épidermodysplasie verruciforme.
2	3, 10a, 10b*, 28*, 29*	Verrues planes ou intermédiaires cutanées ou mu- queuses. Néoplasies intraépithéliales et cancers cutanés. Diagnostic différentiel de l'épidermodys- plasie verruciforme.
3	5, 17a*, 24*	Epidermodysplasie verruciforme. Néoplasies intra- épithéliales et cancers cutanés.
4	5, 8, 12, 14a*, 14b*, 19*, 20*, 21*, 22*, 23*	Epidermodysplasie verruciforme.
5	9, 15*, 17a*, 17b*	Epidermodysplasie verruciforme.
6	24*	Epidermodysplasie verruciforme.
7	5, 8, 14b*, 32*	Cancers cutanés de l'épidermodysplasie verruciforme. Néoplasies intraépithéliales et cancers cutanés.
8	13, 31*	Hyperplasie épithéliale focale ; Diagnostic différentiel des néoplasies intraépithéliales orales.
9	32*	Néoplasies intraépithéliales et cancers cutanés.

1) Les nouveaux types d'HPV entrant dans la constitution des mélanges de sondes sont indiqués par un
 astérisque

Ce tableau indique également les natures des affections susceptibles d'être plus particulièrement diagnostiquées par l'utilisation des mélanges figurant dans la partie gauche du tableau. Il sera remarqué que les regroupements des cartes de restriction dans les figures 1 à 9 ci-jointes sont en conformité avec les regroupements qui sont indiqués dans la colonne "Constitution" du tableau V. C'est également la raison pour laquelle certaines des sondes ont été reproduites à plusieurs reprises dans différentes figures des dessins ci-annexés.

Chacun de ces mélanges peut encore être défini comme comprenant au moins l'une des sondes nouvelles selon l'invention. En d'autres termes les compositions de diagnostic selon l'invention peuvent être définies comme contenant :

- 1) au moins l'ADN de l'HPV2d,
- 2) au moins l'un des ADNs de HPV10b, 28 et 29,
- 3) au moins l'un des ADNs de HPV17, 24,
- 4) au moins l'un des ADNs de HPV14, 15, 17, 19, 20, 21, 22 et 23,
- 5) au moins l'un des ADNs de HPV15 et 17,
- 6) l'ADN de HPV24,
- 7) l'ADN de HPV14, 32,
- 8) l'ADN de HPV31,
- 9) l'ADN de HPV32,

étant entendu que les ADNs des neuf groupes sont choisis de façon à être en toutes circonstances différents les uns des autres.

Etant donné la grande diversité des HPVs susceptibles d'être isolés à partir des différentes formes de verrues ou autres lésions cutanées ou de muqueuses, il est cependant préféré d'utiliser, pour le diagnostic de chaque type d'affection mentionné dans le tableau, des mélanges comportant plus d'un ou deux ADN-HPVs, dès lors que d'autres ADN-HPVs ont été reconnus comme pouvant également intervenir dans le développement du même type d'affection.

Le diagnostic de la nature de l'infection et de son évolution possible sera d'autant plus efficace que le nombre de sondes utilisées sera plus élevé. En outre, des essais d'hybridation réalisés avec des mélanges différents de
5 sondes permettra des diagnostics différentiels présentant un degré de probabilité également plus important de la nature du mal dont souffre le patient.

Dans le tableau V, il n'a été mentionné que des sondes formées à partir d'ADN-HPVs isolés dans le laboratoire des inventeurs. Il va sans dire que, en raison de ce
10 qui précède, les différents mélanges pourront avantageusement être complétés avec des ADNs issus des HPV's obtenus dans d'autres laboratoires, dès lors qu'ils auront été retrouvés à différentes reprises chez des patients affectés par les mêmes types d'infections. Par exemple, le
15 mélange 7 ne peut que gagner à être complété par tous autres ADN-HPVSS rencontrés dans des épidermodysplasies verruciformes à risque de transformation en néoplasies intraépithéliales et cancers cutanés. On remarquera que
20 dans le tableau V, certains des mélanges sont présentés comme caractéristiques des mêmes maladies à diagnostiquer. Il est à remarquer cependant que les différents mélanges font une distinction entre des infections à faible risque de cancérisation et des infections à haut risque de can-
25 cérisation. Par exemple, l'hybridation d'une préparation virale provenant d'un malade soumis à diagnostic avec le mélange 7 témoignera d'un risque de cancérisation cutanée plus important que dans le cas où l'hybridation se produira plutôt avec le mélange 3.

30 De même les EV détectées par le mélange 5 témoigneront d'un risque de cancérisation plus important que les EV détectées par le mélange 6. Le mélange 4 détectera des EV à risque plus élevé encore que celles détectées par le mélange 5.

35 On décrit encore ci-après d'autres mélanges ou cocktails de différents ADN-HPVs (ou sondes contenant ces

ADNs-HPVs ou de séquences de ces derniers), susceptibles d'être utilisés en combinaison pour réaliser des diagnostics globaux des différentes formes d'infections à papillomavirus, éventuellement aux fins de pronostiquer
5 l'évolution possible de l'infection.

Des mélanges préférés conformes à l'invention sont identifiés dans le tableau V susdit.

Le tableau susdit indique également les natures des affections susceptibles d'être plus particulièrement diag-
10 nostiquées par l'utilisation des mélanges figurant dans la partie gauche du tableau. Il est rappelé que les cartes de restriction des autres ADN-HPVs identifiés dans le tableau qui précède sont contenues dans les figures 1 à 9.

Il est à remarquer que le HPV-IP2 peut être consi-
15 déré comme particulièrement représentatif de sondes utilisables pour la détection des risques de développement de néoplasies génitales et, en particulier, de cancers du col de l'utérus.

L'invention concerne donc plus particulièrement
20 encore des troussees ou "kits" de diagnostic comprenant au moins 10 groupes figurant dans les groupes numérotés de 1 à 10 dans le tableau sous la rubrique "Désignation des mélanges".

Dans ce qui précède, on a surtout envisagé l'utili-
25 sation, à titre de sondes, des ADN-HPVs entiers clonés. Ceux-ci peuvent cependant être substitués par des fragments clonés de ces différents ADNs, notamment par les gènes E1 ou L1 et par les gènes E6-E7.

Le principe de base des détections in vitro d'ADN-
30 HPV mettra naturellement en jeu des hybridations opérées dans des conditions strictes ou moins strictes. On peut opérer par exemple comme suit, étant naturellement entendu que les essais de diagnostic décrits ne sauraient être considérés comme limitatifs des conditions d'emploi des
35 sondes ou mélanges de sondes selon l'invention.

L'objet des examens mettant en jeu des sondes préparées à partir de mélanges d'ADNs de HPVs clonés est de mettre en évidence un HPV et d'identifier le type d'HPV dans une biopsie, dans des cellules obtenues par grattage
5 de lésions, ou dans des coupes de biopsies fixées par le mélange de Carnoy (éthanol, chloroforme, acide acétique 6:3:1) et incluses dans la paraffine. L'examen nécessite l'extraction préalable de l'ADN des prélèvements selon des méthodes dont le principe est connu et met en jeu l'analy-
10 se de cet ADN par des expériences d'hybridation moléculaire, effectuées dans des conditions strictes ou moins strictes, à l'aide de sondes radioactives (marquées au ³²P ou au ³⁵S) préparées à partir de mélanges d'ADNs d'HPVs. Chaque examen requiert, en général, l'utilisation de plu-
15 sieurs mélanges de sondes.

Plusieurs méthodes d'hybridation peuvent être utilisées. On peut, par exemple, mettre en oeuvre la méthode d'hybridation sur tache. Cette méthode comporte, après dénaturation de l'ADN, le dépôt d'une quantité aliquote
20 d'ADN sur des membranes (nitrocellulose ou Genescreenplus), l'hybridation de chaque membrane, dans les conditions usuelles, avec un mélange de sondes et la détection des hybrides radioactifs par exposition des membranes au contact d'un film radiographique. On peut
25 aussi utiliser une méthode d'hybridation sur réplique. Cette méthode comprend la séparation électrophorétique en gel d'agarose des fragments d'ADN engendrés après traitement de l'ADN par des enzymes de restriction, le transfert des fragments, après dénaturation alcaline, sur
30 des membranes (nitrocellulose, Genescreenplus) et leur hybridation, dans les conditions usuelles, avec différents mélanges de sondes. La formation d'hybrides radioactifs est détectée après exposition des membranes au contact d'un film radiographique.

35 Les sondes radioactives sont constituées soit par des ADNs d'HPVs marqués par la méthode de "nick-

translation", soit par des ARNs préparés par transcription d'ADNs viraux insérés dans un vecteur, par exemple de type SP6. L'utilisation de sondes radioactives présente l'avantage d'une grande sensibilité, mais ceci n'exclut pas l'utilisation de sondes non radioactives par exemple biotinylées et susceptibles d'être reconnues par des anticorps soit marqués eux-mêmes, soit eux-mêmes reconnus par des anticorps portant un marqueur enzymatique, fluorescent, etc..

10 Le choix des sondes dépend de la nature des prélèvements. Ainsi, par exemple, dans le cas d'un malade suspect d'être atteint de EV, les mélanges 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 seront utilisés. Les mélanges 1 et 2 permettront de faire le diagnostic différentiel entre l'EV et les verrues cutanées. La sonde 3, incluant le membre le plus fréquemment détecté de chacun des trois groupes d'HPVs associés à la maladie, et la sonde 7, contenant les ADNs des types d'HPV associés aux cancers d'EV, permettront le diagnostic de la majorité des cas d'EV et, en particulier, d'identifier les patients infectés par les types d'HPVs présentant un risque pour le développement de cancers. L'utilisation des mélanges 4, 5 et 6 permettront de préciser le type ou les types d'HPV infectant un même malade.

25 L'invention concerne donc encore des nécessaires ou "kits" contenant une pluralité des sondes sus-indiquées, notamment :

- soit des représentants de chacun des 19 types et sous-types d'ADN-HPVs sus-indiqués,
 - 30 - soit des mélanges de sondes, de préférence les divers groupes ou mélanges de sondes qui ont été définis plus haut,
- ces "kits" étant destinés à des études de diagnostic in vitro par hybridation entre des préparations virales obtenues à partir de patients et les divers groupes ou mélanges.

Comme il va de soi et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes ; notamment la référence dans les revendications à une désignation ADN-HPV suivie d'un nombre déterminé, et à laquelle correspond un ADN-HPV dont la carte de restriction a été fournie dans les dessins, s'entend comme - signifiant que ces revendications couvrent tous les ADN-HPVs qui ont en commun avec cet ADN-HPV particulier de pouvoir être classés dans le même type, selon la définition qui en a été donnée plus haut, et a fortiori aux ADN-HPV appartenant au même sous-type.

Il est encore remarqué, en ce qui concerne plus particulièrement l'ADN dérivé de HPV-32, qui apparaît dans les dessins, n'est pas coupé par *AvaI*, *BalI*, *BamHI*, *ClaI*, *EcoRI*, *HindIII*, *NdeI*, *NruI*, *PvuI*, *PvuII*, *SacI*, *SalI*, *SmaI*, *TthIII*, *XmaI*.

On notera que les ADNs recombinants désignés ci-après ont été déposés le 30 novembre 1984 à la C.N.C.M. (Collection Nationale des Cultures de Micro-Organismes de l'INSTITUT PASTEUR de Paris), sous les numéros apparaissant ci-après :

	pBR322/HPV2d	n° I-379
25	pBR322/HPV10bA	n° I-380
	pBR322/HPV10bB	n° I-381
	pBR322/HPV14a	n° I-382
	pBR322/HPV14b	n° I-383
	pBR322/HPV15	n° I-384
30	pBR322/HPV17a	n° I-385
	pHPV5 HindIIIB/HPV17b ...	n° I-386
	pBR322/HPV19	n° I-387
	pBR322/HPV20	n° I-388
	pBR322/HPV21	n° I-389
35	pHPV5 HindIIIB/HPV22	n° I-390
	pBR322/HPV23	n° I-391

	pBR322/HPV24a.....	n° I-392
	pBR322/HPV24b.....	n° I-393
	pBR322/HPV28.....	n° I-394
	pBR322/HPV29.....	n° I-395
5	pBR322/HPV31.....	n° I-396
	pSP64/HPV32.....	n° I-397
	pLI55/IP2.....	n° I-450
	pSP65/IP4.....	n° I-449

L'invention concerne encore plus particulière-
 10 ment les produits d'expression des gènes E6, E7 et sur-
 tout L2, des différents papillomavirus qui ont été évo-
 qués dans ce qui précède.

Ces produits d'expression peuvent eux-mêmes être
 utilisés pour la détection de papillomavirus ou de leurs
 15 produits d'expression dans des prélèvements biologiques
 déterminés et pour l'identification des papillomavirus
 selon les types, ou sous-types auxquels ils peuvent ap-
 partenir. Les conditions dans lesquelles ces produits
 d'expression peuvent être obtenus seront illustrées dans
 20 la suite de cette description, notamment en rapport avec
 l'expression de la séquence L2 du papillomavirus HPV
 1.a, étant entendu que des techniques semblables peuvent
 être utilisées pour induire l'expression des séquences
 génétiques L2 (ou de E6, E7 ou L1) provenant d'autres
 25 types de papillomavirus. Dans ce qui suit, il sera, sauf
 exception, plus particulièrement fait référence aux
 séquences ou gènes L2, étant entendu cependant que les
 enseignements fournis à propos des produits d'expression
 des gènes L2 peuvent éventuellement être transposés aux
 30 produits d'expression des autres gènes dont question
 ci-dessus. Les produits d'expression des séquences L2
 présentent cependant un intérêt tout particulier, en ce
 qu'ils peuvent eux-mêmes être utilisés pour la produc-
 tion in vivo d'anticorps susceptibles de reconnaître les
 35 produits d'expression du gène L2 dans des prélèvements

biologiques affectés par le papillomavirus correspondant et pas par un papillomavirus de type différent, et plus particulièrement lorsque les préparations du genre en question ont préalablement été fixées. Le mode de réalisation nouveau de l'invention dont question ci-après fournit donc des moyens distincts permettant de déterminer les types de papillomavirus présents dans une lésion étudiée, afin d'en évaluer la gravité et de choisir la thérapie à suivre. Les anticorps produits contre les différents types de produits d'expression des gènes L2 peuvent être groupés en mélanges correspondant à ceux qui ont été identifiés plus haut en rapport avec les sondes d'hybridation.

L'invention fournit par conséquent aussi des nécessaires ou "kits" comportant une pluralité d'anticorps distincts et permettant des essais successifs de détection, le cas échéant d'identification ou de classification, de papillomavirus nouvellement isolés. Par exemple, un nécessaire ou kit conforme à l'invention comprend une pluralité de réactifs constitués d'anticorps ou de mélanges d'anticorps distincts, par exemple de réactifs comprenant respectivement des anticorps formés contre les produits d'expression des gènes L2 de papillomavirus groupés de la façon qui suit :

- 25 1) au moins HPV2d,
- 2) au moins l'un parmi les HPVs 10b, 28 et 29,
- 3) au moins l'un parmi les HPVs 17, 24,
- 4) au moins l'un parmi les HPVs 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23 et IP4,
- 30 5) au moins l'un parmi les HPVs 15 et 17,
- 6) l'HPV 24,
- 7) au moins l'un parmi les HPVs 14, 32 et IP4,
- 8) l'HPV 31,
- 9) l'HPV 32,
- 35 10) au moins l'un parmi les HPV 16, 18 et IP2,

étant entendu que les anticorps des dix groupes sont choisis de façon à être en toutes circonstances différents les uns des autres, dans la mesure où chacun des dix groupes serait réduit à un seul des anticorps qui le composent.

Les anticorps formés contre les produits d'expression des gènes L2 (ou contre des protéines recombinantes contenant ces produits d'expression fusionnés avec un polypeptide supplémentaire, particulièrement un polypeptide stabilisant, n'entraînant pas la modification des propriétés immunogènes du produit d'expression des gènes L2) sont utilisables pour la détection directe de virus dans des coupes histopathologiques provenant de lésions induites par les papillomavirus chez les sujets qui en sont affectés. Avantageusement, la détection se fait sur des préparations fixées au préalable dans des conditions dissociantes, par exemple avec le milieu ou mélange de CARNOY déjà mentionné plus haut (également décrit dans l'ouvrage de L. LISON, intitulé (Histochimie et cytochimie animales").

Les anticorps anti-L2 éventuellement fixés peuvent être reconnus par d'autres anticorps formés contre les premiers, ces autres anticorps portant des marqueurs appropriés, de préférence non radioactifs. Ces marqueurs sont par exemple de nature enzymatique ou fluorescente.

L'invention concerne naturellement également les polypeptides eux-mêmes qui résultent de l'expression des gènes L2 des papillomavirus. Ces produits d'expression ont déjà dans ce qui précède été dénommés "protéines L2". Elle concerne encore les polypeptides dans lesquels cette protéine L2 se trouve fusionnée à d'autres séquences polypeptidiques, dans la mesure où celles-ci ne modifient pas de façon essentielle les propriétés immunogènes de la protéine L2. La présence de ces autres

fragments polypeptidiques peut notamment résulter du mode de production utilisé de ces polypeptides hybrides, surtout lorsqu'ils ont été obtenus par des procédés mettant en jeu des techniques du génie génétique.

5 Avantageusement, l'invention concerne des polypeptides hybrides contenant une séquence dérivée de la bêta-galactosidase. De tels produits peuvent notamment être obtenus par transformation de E. coli avec des vecteurs appropriés (phages ou plasmides) modifiés par tout ou

10 partie de l'opéron lactose et comportant en outre, insérée en aval du promoteur de l'opéron-lactose (ou de tout autre promoteur approprié, par exemple de phage lambda), la séquence nucléotidique dérivée d'un gène L2 issu d'un papillomavirus de type déterminé. On a avan-

15 tageusement recours à des plasmides ou phages de ce type comprenant une partie au moins du gène de la bêta-galactosidase de l'opéron-lactose.

L'invention concerne également des groupes de polypeptides distincts, ces polypeptides correspondant

20 chaque fois à une partie seulement des protéines L2 complète dont il a été question plus haut, étant cependant entendu que les polypeptides de ces divers groupes comprennent chaque fois les sites antigéniques caractéristiques des protéines L2 du genre en question.

25 Les polypeptides selon l'invention peuvent également, lorsqu'ils ont été purifiés, être mis en oeuvre dans des techniques de purification des anticorps qui leur correspondent, notamment à partir de sérums d'animaux qui avaient été immunisés par ces polypep-

30 tides. En particulier, ces polypeptides peuvent être fixés sur des colonnes d'affinité. Les opérations de purification des anticorps consistent alors à faire passer le sérum les contenant au contact de colonnes d'affinité portant les susdits polypeptides. Les anti-

35 corps sélectivement fixés sur ces colonnes peuvent

ensuite être récupérés par dissociation des complexes antigènes-anticorps, au moyen d'un tampon approprié, présentant une force ionique adéquate, par exemple une solution d'un sel tel que l'acétate d'ammonium. On peut
5 également avoir recours à des solutions acidifiées.

L'invention concerne enfin les compositions mettant en jeu ces antigènes (ou groupes d'antigènes) et anticorps (ou groupes d'anticorps).

En particulier, l'invention concerne des groupes
10 contenant l'un ou, de préférence, un "cocktail" d'anticorps dérivés des ensembles de papillomavirus, tous réputés être souvent présents dans un type d'affection donné. Ces cocktails (contenant ces anticorps ou groupes d'anticorps : mélange de sérums ou compositions d'anti-
15 corps purifiés en association avec un véhicule pharmaceutique approprié) sont alors susceptibles d'être mis en oeuvre par administration, notamment parentérale, au malade concerné, dans le traitement de l'affection donnée, dès lors que celle-ci aura été diagnostiquée
20 cliniquement, à l'issue d'un essai de diagnostic in vitro sur un prélèvement histologique ou cytologique provenant de ce malade, ou qu'un essai de diagnostic in vivo aura révélé l'appartenance du papillomavirus infectieux à un type semblable à celui de l'un des papillomavirus de l'ensemble sus-indiqué. Ces sérums sont alors
25 susceptibles de provoquer une régression des infections induites par les papillomavirus de types ou sous-types correspondants.

L'invention concerne enfin les compositions
30 vaccinales correspondantes contenant une ou de préférence plusieurs protéines L2, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable adapté au mode d'administration choisi, notamment par voie parentérale utilisable pour protéger les personnes soumises à de
35 hauts risques d'être atteints par l'affection

correspondante.

Il est enfin fait référence aux articles dont les références bibliographiques suivent, lesquels complètent en tant que de besoin la description de l'état de la technique antérieure, dans la mesure où cela pourrait s'avérer utile à la compréhension complète du texte par le lecteur. A ce titre, le contenu de ces articles doit donc être considéré comme faisant partie de la description.

Une méthodologie préférée pour produire une protéine L2 (ou un fragment de cette protéine) mettant en jeu un fragment de phase ouverte du gène L2 d'un papillomavirus donné, va être illustrée en rapport avec la description de la construction d'un vecteur incorporant ces fragments de phase ouverte, puis des conditions dans lesquelles on peut induire l'expression de la protéine L2 ou de ce polypeptide dans E. coli. Un procédé de purification de la protéine ou de ce polypeptide ainsi que sa mise en oeuvre dans la production de sérums contenant des anticorps dirigés contre ces protéines ou ce polypeptide seront également décrits.

Il sera clair pour l'homme du métier que le fragment utilisé de phase ouverte de L2 devra chaque fois être fusionné en phase dans le vecteur utilisé, le cas échéant avec un gène codant pour une protéine assurant la stabilité ou facilitant la purification ultérieure de la protéine hybride alors formée.

La séquence de fabrication est illustrée dans la figure 11 ci-jointe.

30 MATERIELS ET METHODES.

1) TRAITEMENT DES ADNs.

En ce qui concerne les recombinaisons d'ADNs, la préparation des plasmides et des fragments d'ADN, la formation des extrémités franches, la digestion par l'enzyme Bal 31 et enfin la transfection des cellules,

on a eu recours aux Techniques de Maniatis, T. et al. (1982), décrites dans le chapitre "Molecular cloning" (Clonage moléculaire) de l'ouvrage "A Laboratory Manuel" (Manuel de Laboratoire) de Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NEW-YORK, U.S.A.

2) BACTERIES, PLASMIDES ET VIRUS.

Les ADNs plasmidiques ont été obtenus à partir de pHPVI.a (Danos et al, 1982 et brevet français 82 05887 du 5 Avril 1982) contenues dans E. coli (cellules C 600), de pCQV2 qu'hébergeaient des cellules RRI (queen, 1983) et de pMC1403 qu'hébergeaient des cellules MC1000 (Casadaban, 1983).

Les plasmides intermédiaires construits et le plasmide pHPL2 ont été passés plusieurs fois dans des cellules de E. coli MM 294 et les plasmides pHPL2-bêta-galactosidase dans des cellules MC1000 déficientes en bêta-galactosidase. Les souches Lac⁺ ont été détectées sous forme de colonies rouges sur des plaques d'agar de Mc Conkey contenant du lactose (Silhavy et al, 1984, dans "Experiments with gene fusions" - Expériences avec des fusions de gènes - : Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NEW-YORK).

Les plasmides pHPL2 et pHPL2-bêta-gal ont ensuite été transfectés dans une souche lon⁻ déficiente en protéase, CAG1139 (Grossman et al, 1983, Cell 32, 151-159).

3) PREPARATION DE LYSATS BACTERIENS ET LEUR ANALYSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE AVEC DODECYLSULFATE DE SODIUM (PAGE-SDS).

Après culture pendant une nuit, des cellules CAG 1139 contenant pHPL2 ou pHPL2-bêta-gal 116 ont été diluées de 5 à 20 fois dans un milieu LB. Elles ont été ensuite cultivées à 30°C, jusqu'à atteindre une Densité Optique 600 de 0,5-0,9.

Le promoteur lambda-PR a ensuite été dérèprimé

en faisant pousser les cellules à 41°C pendant 90 minutes. Les cultures ont été recentrifugées et les culots recueillis, suspendus dans un milieu 62 mM Tris, pH 6,8 contenant 2 % de SDS, 26 % de glycérol, du 2-mercapto-
5 éthanol 2 M et 0,03 % de bleu de bromophénol. Un lysat de cellules CAG 1139 ne contenant pas de plasmide a été utilisé comme témoin.

Après traitement à 100°C pendant 10 minutes, des échantillons ont été soumis à électrophorèse dans un gel
10 de polyacrylamide - SDS à 10 % selon la technique de Laemli (1970), Nature, 227, 680-684. Des protéines pré-colorées BRL de poids moléculaires connus étaient également soumises à électrophorèse.

Les bandes de protéines ont été visualisées par
15 coloration avec le colorant connu sous la désignation "amido black" et transférées sur une feuille de nitro-cellulose pour analyse par la méthode dite "western blot" (transfert "Western").

4) ANALYSE.

20 L'analyse par "Western Blot" a été réalisée comme décrit par Rosetto et al (1984) J. Gen. Virol. 65, 1319-1324, en mettant en oeuvre des anticorps polyclonaux de papillomavirus (Orth et al (1978), Virology 91, 243-255 et Rosetto et al déjà cité) et des immunoglobu-
25 lines IgG anti-cobaye et anti-lapins conjugués à de la peroxydase de Raifort.

5) ANALYSE D'ANTICORPS.

On a eu recours aux techniques d'immunodiffu-
sion, d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase anté-
30 rieurement décrites (Orth et al, 1984, et Rosetto et al, 1984) en utilisant des particules virales de HPV1.a purifiées ou des coupes de lésions induites par des types de papillomavirus distincts.

6) PURIFICATION DES PROTEINES DE FUSION L2-BETA-GALACTO-
35 SIDASE.

Une culture de CAG 1139 hébergeant pHPL2-bêta-galactosidase 116 a été diluée 200 fois dans le milieu LB et a été cultivée jusqu'à atteindre une D.O.600 de 0,32. La culture a alors été rapidement portée à 41°C et
5 cultivée à haute température pendant 90 minutes.

Le culot de cellules a été resuspendu dans un milieu Tris 20 mM, pH 7,5, Mg Cl₂ 10mM, et soumis à un traitement de rupture des cellules aux ultrasons.

La protéine de fusion soluble dans la préparation a été purifiée par chromatographie d'affinité sur
10 une colonne p-aminophényl-β-D-thiogalactoside (TPEG)-SEPHAROSE comme décrit par Ullmann (1984). Gene 29, 27-31.

La protéine de fusion purifiée comme indiqué
15 ci-dessus a été utilisée pour immuniser des cobayes Harley femelles. Les animaux reçurent 3 injections sous-cutanées, à des sites distincts, d'environ 150 microgrammes de protéines, en présence d'adjuvant complet de Freund (DIFCO) à des intervalles de 2 à 3
20 semaines. Le sérum a été prélevé une semaine après la troisième injection.

RESULTATS.

CONSTRUCTION DE PLASMIDES CAPABLES D'EXPRIMER LE CADRE DE LECTURE OUVERTE L2 DANS ESCHERICHIA COLI.

25 Les constructions sont représentées à la figure 1. Le cadre de lecture ouverte L2 a été cloné en vue de son expression dans Escherichia coli (E. coli). Le plasmide pHPV1.a contient le génome entier de HPV1.a cloné sur le site BamHI du plasmide pBR322 par Danos et
30 al (EMBO J.1, p. 231-236, 1982). Dans le but d'isoler les cadres de lecture ouverte de la région tardive du génome viral, on a subcloné un fragment Hind III-Hpa II d'un plasmide pHPV 1.a dans un plasmide pBR322. Le plasmide obtenu a été appelé pHPL9. Ce plasmide a été
35 raccourci en enlevant un fragment BamHI-Pvu II non

essentiel dans la région pBR322. A partir du plasmide résultant pHPL 9.3, on a isolé un fragment XhoII-XmnI comportant les 1526 paires de base (p.b.) du cadre de lecture ouverte moins les 318 paires terminales 5'.

5 Le codon d'arrêt du cadre de lecture ouvert L2 est conservé.

Le fragment L2 obtenu a ensuite été inséré dans le vecteur d'expression pCQV2 (queen 1983) à la place d'un fragment BamHI-PvuII non essentiel. Le cadre de lecture ouverte L2 se trouve ainsi directement adjacent au codon ATG de départ et à la séquence SD (Shine and Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, p. 1342-1346, 1974) du gène cro du phage lambda et sous le contrôle du promoteur lambda PR. Le promoteur est régulé par le répresseur CI857 sensible à la température, lui permettant de contrôler la production du produit d'expression de L2. On a ainsi obtenu le plasmide pHPL2 dans lequel les 1206 paires de bases de la partie C terminale du cadre de lecture ouverte L2 sont en phase avec le codon de départ ATG de cro du phage lambda. Le respect de la phase de lecture a été vérifié par la présence d'un site de restriction XhoII à la jonction BamHI/Bgl II.

Dans le but de stabiliser la protéine L2 synthétisée dans E. coli et de disposer d'une méthode convenable pour la purifier, il a été décidé de l'exprimer aussi comme une protéine hybride fusionnée avec la bêta-galactosidase de E. coli.

Pour réaliser ceci, le codon final L2 a été éliminé après linéarisation du plasmide pHPL2 au site BstEII, suivi par une digestion avec l'enzyme Bal31.

Cet ADN, qui comporte le gène L2 et les séquences fournissant les signaux de transcription et de traduction, a été raccourci par digestion avec PstI, avant d'être inséré dans le plasmide pMC1403 (Casadaban, Methods in enzymology 100, p. 293-308, 1983) à la place du

fragment PstI-SmaI.

PMC1403 comporte l'opéron lac sans son promoteur et les 22 premières paires de bases de la phase ouverte du gène de la bêta-galactosidase. Le recombinant a été
5 transfecté dans les cellules MC 1000, lac⁻. La production à température élevée de bêta-galactosidase dans les clones obtenus a permis de sélectionner sur des plaques agar lactose Mc Conkey (Silhavez et al, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1984) les plasmides pHPL2 bêta
10 gal dans lesquels les gènes pour le L2 et le bêta-galactosidase sont en phase.

Le clone pHPL2, bêta gal 116 sélectionné selon une telle méthode a été étudié ultérieurement.

Le séquençage de l'ADN (résultats non montrés
15 ici) a indiqué que seulement les deux derniers acides aminés C-terminaux du cadre de lecture ouvert L2 avaient été perdus au cours de la digestion par Bal 31 et que le produit exprimé par le cadre de lecture ouverte L2 était lié par une proline au neuvième acide aminé de la
20 bêta-galactosidase.

PRODUCTION DE PROTEINES APPARENTÉES AU HPV1.a PAR DES CELLULES TRANSFECTÉES AVEC pHPL2 et pHPL2.bêta gal 116.

Le plasmide pHPL2 a une capacité de codage pour une protéine L2 d'environ 51.2 Kd et de pHPL2-bêta gal
25 pour une protéine hybride d'environ 167 Kd.

Pour étudier la production de protéines par ces plasmides, ils ont d'abord été transfectés dans une souche de E. coli CAG 1139 lon⁻, protéase déficiente. Les cellules ont ensuite été cultivées à 30°C avant
30 d'être exposées à 41°C, en vue d'induire la production de protéines sous le contrôle du promoteur lambda PR. Les lysats bactériens obtenus ont été électrophorés sur un gel de polyacrylamide - SDS.

Les protéines apparentées aux virus HPV1.a ont
35 été révélées par analyse selon la technique dite du

"Western Blot", avec des anticorps anti-virus HPV1.a. Pour les cultures ayant poussé à 30°C, les résultats d'analyse ont été les mêmes pour les cellules contenant ou ne contenant pas un plasmide, mais pour les cellules
5 induites à 41°C, des bandes spécifiques de protéines ont été démontrées dans les cellules transfectées : parmi les protéines isolées à partir des cellules transfectées avec le recombinant pHPL2-bêta gal 116, on a isolé une bande principale ayant le poids moléculaire attendu,
10 d'approximativement 167 Kd, correspondant à une protéine de fusion L2 bêta-galactosidase (L2-bêta gal), et plusieurs bandes mineures de poids moléculaires d'environ 58 Kd, résultant probablement d'une dégradation protéolytique.

15 Pour la construction pHPL2, une bande de protéine d'environ 72 Kd a été révélée. Ce poids moléculaire est plus élevé que celui espéré de 51,2 Kd. La signification de cette différence reste à élucider.

Pour étudier ensuite l'antigénicité de la protéine produite dans E. coli, on a purifié le produit
20 L2-bêta gal du lysat bactérien d'une culture induite par la chaleur, par affinité chromatographique sur une colonne de TPEG-SEPHAROSE (Ullman, Gene 29, p. 27-31, 1984). Les protéines éluées de la colonne ont été analysées sur un gel de polyacrylamide-SDS. La coloration
25 avec un "amido-black" a révélé trois bandes de protéines principales, l'une de poids moléculaire élevé correspondant probablement à la protéine hybride L2-bêta gal, une seconde migrant conjointement avec la bêta-galactosidase purifiée et une troisième avec un poids moléculaire d'environ 60 Kd.
30

Cette protéine de bas poids moléculaire pourrait correspondre à un contaminant. L'analyse par la technique du "Western Blot" avec un anticorps spécifique du
35 type HPV1.a a révélé une bande principale de poids

moléculaire élevé correspondant au produit d'expression L2-bêta gal et plusieurs bandes secondaires (figure 3b).

Immunogénicité du produit L2-bêta gal.

5 Pour tester l'immunogénicité de la protéine de fusion, le produit élué a été injecté dans deux cobayes. Les sérums ont été recueillis après la troisième injection. Par une analyse au "Western Blot", les sérums obtenus ont réagi avec des bandes migrant comme la protéine de fusion L2-bêta gal ou comme le produit L2 dans
10 les lysats bactériens issus de cultures induites à la chaleur contenant respectivement le plasmide pHPL2-bêta gal 116 ou le plasmide pHPL2.

 Dans les deux types de lysats de cellules, les
15 sérums ont reconnu des protéines (environ 60 et 55 Kd) trouvées également dans les lysats de contrôle CAG 1139. Au moins l'une d'entre elles paraît correspondre à la protéine copurifiée avec la protéine de fusion L2-bêta gal et le bêta galactosidase.

20 Les sérums ont reconnu des protéines d'environ 80 Kd dans une préparation virale HPV1.a dissociée (traitée par un détergent) et dans un extrait de verrue induite par HPV1.a.

 Dans un test d'immunodiffusion, les sérums de
25 cobaye obtenus n'ont pas précipité les particules HPV1.a virales intactes utilisées comme antigènes, ce qui indiquait de nouveau que les antigènes viraux reconnus par le sérum dans la technique d'immunotransfert peuvent ne pas être disponibles à la surface du virion ou que les
30 sérums ne précipitent pas.

 Dans des sections de verrue HPV1.a congelées qui sont connues pour conserver la structure conformationnelle native des virions et des polypeptides viraux, les sérums induits par les produits d'expression de L2 n'ont
35 pas réagi. Ce résultat témoigne encore une fois de ce

que les anticorps ne sont pas dirigés contre un antigène conformationnel.

Les sérums n'ont que peu réagi (à une dilution au 1/50ème) avec des coupes de verrues infectées avec
5 HPV1.a fixées dans le milieu de BOUIN. Ce résultat confirme le caractère spécifique de type des antigènes concernés par opposition aux antigènes de groupe qui conduisent à des réactions antigène-anticorps plus fortes avec des coupes infectées par un virus et fixées
10 par le milieu de BOUIN.

Au contraire, les observations faites sur des coupes par le milieu de CARNOY se sont révélées fournir des réactions positives tant avec les antigènes de type qu'avec les antigènes de groupe. En particulier, on
15 constate que les sérums de cobayes donnaient des réactions antigène-anticorps très fortes (jusqu'à une dilution de 1/1000) lorsque la coupe contenait un virus du même type que celui ayant fourni l'antigène à partir duquel avait été formé l'anticorps utilisé dans l'essai.
20 Au contraire, aucune réaction immunologique croisée n'a été reconnue lorsque le sérum à l'étude était mis au contact de coupes contenant un virus appartenant à un type différent.

Il faut aussi préciser que les types envisagés
25 pour les antigènes ne coïncident pas nécessairement toujours avec les types tels qu'ils ont été définis plus haut vis-à-vis des capacités d'hybridation mutuelles des génomes de deux papillomavirus distincts.

On rappellera en particulier la distinction de
30 deux sortes d'antigènes chez les papillomavirus :

- les antigènes de type, caractérisés par l'absence de réaction antigénique croisée entre les différentes sortes de papillomavirus, en utilisant des anticorps obtenus après injection de virions entiers,
- 35 - et les antigènes de groupe, essentiellement masqués

dans le virion, et mis en évidence par des anticorps après injection de particules virales dissociées.

Les papillomavirus appartenant à des types différents dans les essais de réactions anticorps-
5 antigènes sont ceux dont les séquences codantes L2, de préférence dépourvues de leurs régions homologues respectives, codent pour des polypeptides qui ne permettent pas la réalisation de réactions antigènes-anticorps croisées avec leurs anticorps respectifs.

10 Des antigènes de types préférés sont ceux qui sont codés par les cadres de lecture ouverte du gène L2 dépourvu de la région N terminale, notamment sur le 1/4 de la longueur des régions L2 en cause.

L'invention concerne finalement également un
15 test pour rechercher, dans des virus appartenant à des types différents, ceux des polypeptides codés par les régions L2 qui ne donnent pas les réactions croisées. Ces polypeptides peuvent être définis comme ceux dont les anticorps réagissent efficacement avec des virus
20 contenus dans des coupes histologiques ou cytologiques fixées par le milieu de Carnoy, mais qui ne réagissent que mal, voire même pas du tout, avec les mêmes coupes lorsque celles-ci sont fixées par le milieu de Bouin.

L'invention concerne également un procédé de
25 classification de papillomavirus nouveaux vis-à-vis de papillomavirus connus. Ce procédé est défini dans la revendication 8 qui fait également partie de la présente description.

Enfin, l'invention concerne aussi le procédé de
30 diagnostic comprenant l'identification du type de virus infectieux éventuellement présent chez un patient, consistant à faire réagir des antigènes préalablement obtenus contre des virus appartenant à différents types avec un prélèvement biologique, notamment de sérum,
35 provenant d'un malade pour qui le test doit être

réalisé.

Le virus infectieux sera présumé appartenir à un type déterminé dès lors que l'on observera une réaction antigène-anticorps entre un prélèvement de sérum et un antigène provenant d'un papillomavirus appartenant à ce même type. Ces essais de diagnostic peuvent être réalisés par exemple en mettant en oeuvre la méthode d'ELISA.

Plus particulièrement l'invention concerne un procédé de détection de l'appartenance ou non d'un papillomavirus infectieux dans un échantillon biologique humain, tel qu'un tissu ou fluide, par exemple un sérum, à un type donné de papillomavirus. Ce procédé est caractérisé par la mise en contact de cet échantillon biologique avec des anticorps préalablement formés contre un produit d'expression d'un ADN contenant au moins une partie de la région L2 du génome d'un virus appartenant à ce type, cette mise en contact étant réalisée dans des conditions et pendant une durée permettant la réalisation d'une réaction immunologique. La détection de la formation d'un complexe antigène-anticorps témoigne alors de la présence d'un papillomavirus ayant un type identique ou apparenté à celui dont provenait le susdit produit d'expression.

De préférence, l'ADN contenant la région L2 ou la partie correspondante a été cloné dans un hôte cellulaire compétent, tel qu'une bactérie, par exemple E. coli.

Avantageusement la partie de région L2 mise en oeuvre correspond au cadre de lecture ouverte du gène L2 dépourvu de la région N-terminale non caractéristique de type. De préférence, cette région N-terminale correspond au premier quart de ce cadre de lecture.

Plus particulièrement, l'invention concerne un

procédé de détection de ce type dans lequel l'ADN contenant la susdite partie de région L2 (ou la région L2 entière) est un ADN hybride formé à partir d'un acide nucléique codant pour une protéine normalement exprimable dans l'hôte cellulaire compétent choisi et dans lequel
5 la susdite région L2 aura été incorporée au préalable, notamment par recombinaison in vitro.

Par exemple la protéine normalement exprimable dans l'hôte cellulaire correspond à tout ou partie de la bêta-galactosidase, lorsque cet hôte cellulaire est
10 E. coli.

Le procédé de détection selon l'invention est applicable à toute coupe histologique fixée, de préférence dans le milieu de Carnoy, ou encore directement à un sérum.

15 Le procédé selon l'invention comprend également la mise en contact de l'échantillon biologique dans les conditions sus-indiquées avec des "cocktails" d'anticorps préalablement formés contre des produits d'expression des régions L2 -ou de leurs parties correspon-
20 dantes respectives- originaires de plusieurs virus de mêmes types ou de types apparentés, en particulier de virus regroupés de la même façon qu'indiqué ci-dessus, en rapport avec les sondes d'ADN.

L'utilisation de ces "cocktails" d'anticorps
25 permet alors, dans des conditions semblables à celles qui ont été évoquées en rapport avec les sondes d'ADN, de procéder à des corrélations entre l'appartenance détectée à une catégorie donnée de papillomavirus et la maladie dont le patient étudié souffre -ou à laquelle il
30 est potentiellement exposé.

L'invention concerne finalement un procédé de fabrication de chacun des susdits polypeptides hybrides et des anticorps correspondants.

Ce procédé comprend :

- l'incorporation, notamment in vitro, de la région L2 du génome du papillomavirus concerné ou de la partie de région correspondante dans un vecteur approprié ;

5 - la transformation d'un hôte cellulaire compétent avec le vecteur ainsi modifié, c'est-à-dire d'un hôte susceptible d'exprimer la susdite région L2 ou la partie correspondante ; et

10 - la récupération et, de préférence, la séparation du polypeptide résultant de l'expression de la région L2 ou de la partie correspondante, ce polypeptide étant capable d'induire in vivo la production d'anticorps capables de détecter des protéines du papillomavirus dans les conditions sus-indiquées.

15 L'invention concerne encore le procédé de production desdits anticorps, caractérisé par l'immunisation d'un animal, par exemple un lapin, avec les susdits polypeptides, et la récupération des anticorps formés.

20 Enfin l'invention comprend éventuellement le regroupement soit des peptides hybrides, soit des anticorps, obtenus à partir de divers papillomavirus, selon les différents types auxquels ceux-ci peuvent s'avérer appartenir.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Derst, M. et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 3812-3815.
- (2) Coggin, J.R., Jr. et al., 1979, Cancer Res., 39,
5 545-546.
- (3) Gissmann, L. et al., 1982, J. Virol. 44, 393-400.
- (4) Green, M. et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 4437-4441.
- (5) Heilman, C.A. et al., 1980, Virol. 36, 395-407.
- 10 (6) Jablonska, S. et al., 1972, Cancer Res., 32, 583-589.
- (7) Jablonska, S. et al., 1982, Springer Semin. Immunopathol. 5, 33-62.
- (8) Kremsdorf, D. et al., 1982, J. Virol. 43, 436-447.
- 15 (9) Kremsdorf, D. et al., 1983, J. Virol. 48, 340-351.
- (10) Lutzner, M.A. et al., 1978, Bull. Cancer, 65, 169-182.
- (11) Lutzner, M.A. et al., 1983, Lancet ii, 422-424.
- (12) Migozzi, M. et al., 1965, Bull. Soc. Franc. Derm.
20 Syph. 72, 747-748.
- (13) Orth, G. et al., 1980, Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation, 7, 259-282.
- (14) Orth, G. et al., 1981, J. Invest. Dermatol. 76, 97-102.
- 25 (15) Orth, G. et al., 1979, Cancer Res. 39, 1074-1082.
- (16) Ostrow, R.S. et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 1634-1638.
- (17) Ostrow, R.S. et al., 1983, Ann. Acad. Dermatol. 8, 398-404.
- 30 (18) Pfister, H. et al., 1983, Cancer Res. 43, 1436-1441.
- (19) Pfister, H. et al., 1983, J. Virol. 47, 363-366.
- (20) Pfister, H. et al., 1981, Int. J. Cancer, 27, 645-650.
- 35 (21) Rueda, L.A. et al., 1976, Med. Cut. I.L.A. 2,

113-136.

(22) Ruiter, M. et al. J. Invest. Dermatol., 47,
247-252.

(23) Sutcliffe, J.G., 1978, Nucleic Acids Res. 5,
5 2721-2728.

(24) Tsumori, T. et al., 1983, J. Gen. Virol. 64,
967-969.

10

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS

1. Ensemble de compositions de polypeptides ou de groupes de polypeptides, correspondant aux produits d'expression de tout ou partie des gènes E6, E7 ou, de préférence, L2 des papillomavirus respectivement dérivés :

- 1) d'au moins l'HPV2d,
 - 2) de l'un au moins des HPVs 10b, 28 et 29,
 - 3) de l'un au moins des HPVs 17, 24,
 - 10 4) de l'un au moins des HPVs 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23 et IP4,
 - 5) de l'un au moins des HPVs 15 et 17,
 - 6) de HPV 24,
 - 7) de l'un au moins des HPVs 14, 32 et IP4,
 - 15 8) de HPV 31,
 - 9) de HPV 32,
 - 10) de l'un au moins des HPV 16, 18 et IP2,
- étant entendu que les polypeptides des dix groupes sont choisis de façon à être en toutes circonstances différents les uns des autres dans la mesure où chacun des dix groupes serait réduit à un seul des polypeptides qui le composent.

2. Ensemble selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites compositions contiennent respectivement, en association avec lesdits polypeptides, un véhicule pharmaceutiquement acceptable, permettant l'utilisation d'une ou de plusieurs de ces compositions pour une vaccination contre les papillomavirus correspondants.

30 3. Ensemble d'anticorps ou de groupes d'anticorps, contre les produits d'expression de tout ou partie des gènes E6, E7, ou, de préférence, L2 des papillomavirus respectivement dérivés :

- 1) d'au moins l'HPV2d,
- 35 2) de l'un au moins des HPVs 10b, 28 et 29,

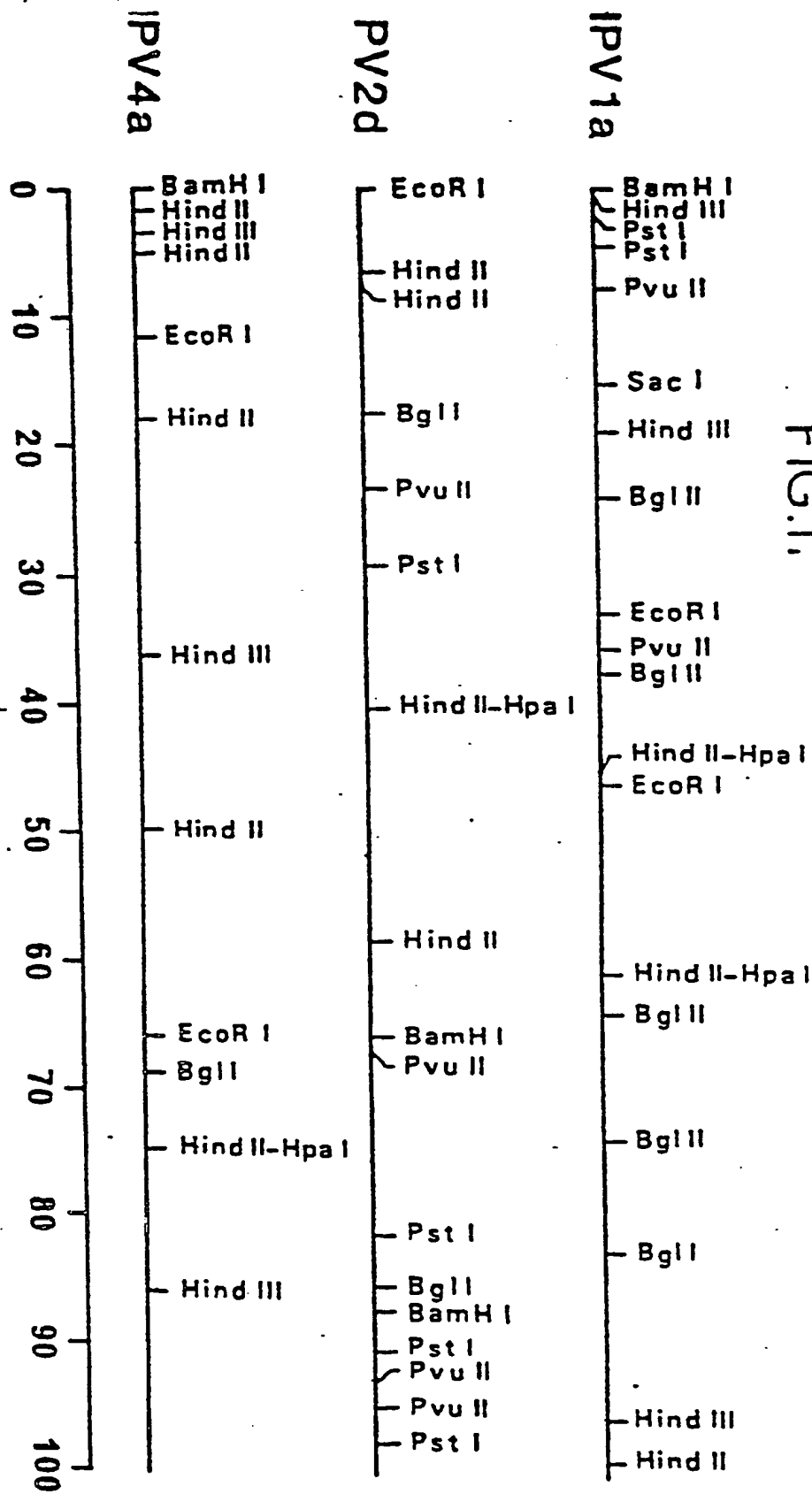
- 3) de l'un au moins des HPV's 17, 24,
- 4) de l'un au moins des PV's 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23 et IP4,
- 5) de l'un au moins des HPV's 15 et 17,
- 5 6) de HPV 24,
- 7) de l'un au moins des HPV's 14, 32 et IP4,
- 8) de HPV 31,
- 9) de HPV 32,
- 10) de l'un au moins des HPV 16, 18 et IP2,
- 10 étant entendu que les anticorps des dix groupes sont choisis de façon à être en toutes circonstances différents les uns des autres dans la mesure où chacun des dix groupes serait réduit à un seul des anticorps qui le composent.
- 15 4. Ensemble selon la revendication 3, caractérisé en ce que lesdites compositions contiennent respectivement en association avec lesdits anticorps un véhicule pharmaceutiquement acceptable, permettant l'utilisation d'une ou de plusieurs de ces compositions,
- 20 pour induire, à l'occasion de leur administration à un sujet porteur des papillomavirus correspondants, une régression des infections induites par ces papillomavirus.
- 25 5. Procédé de diagnostic in vitro de la nature d'un papillomavirus isolable ou contenu dans un prélèvement histologique ou cytologique d'un patient susceptible de le porter, caractérisé par la mise en contact de ce prélèvement avec les différents anticorps ou groupes d'anticorps, selon la revendication 3 et la
- 30 détection de celui ou de ceux des anticorps qui restent fixés à ce prélèvement.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le prélèvement se présente sous forme de préparation ou coupe histologique fixée.
- 35 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé

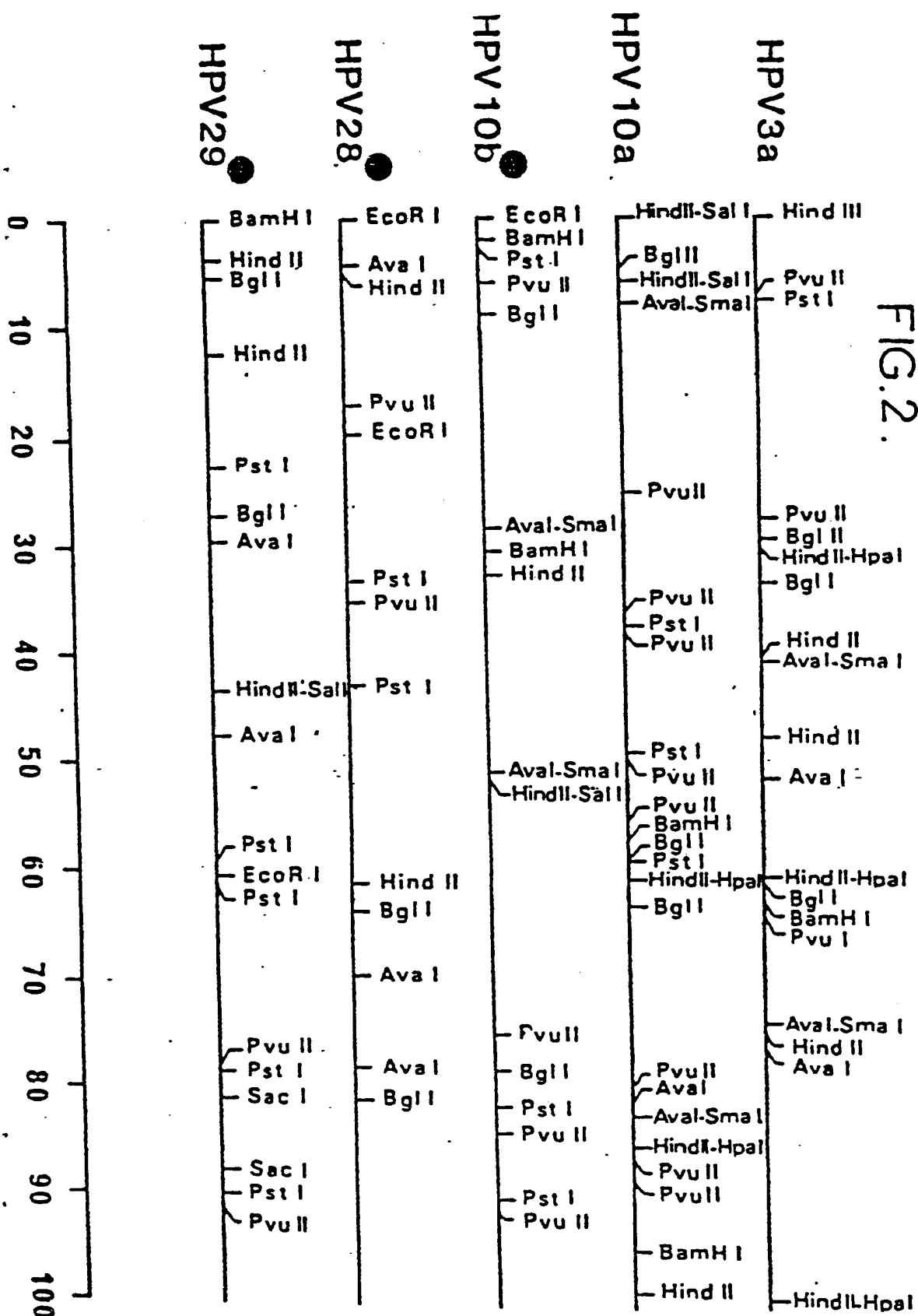
en ce que la coupe histologique est fixée par le milieu de Carnoy.

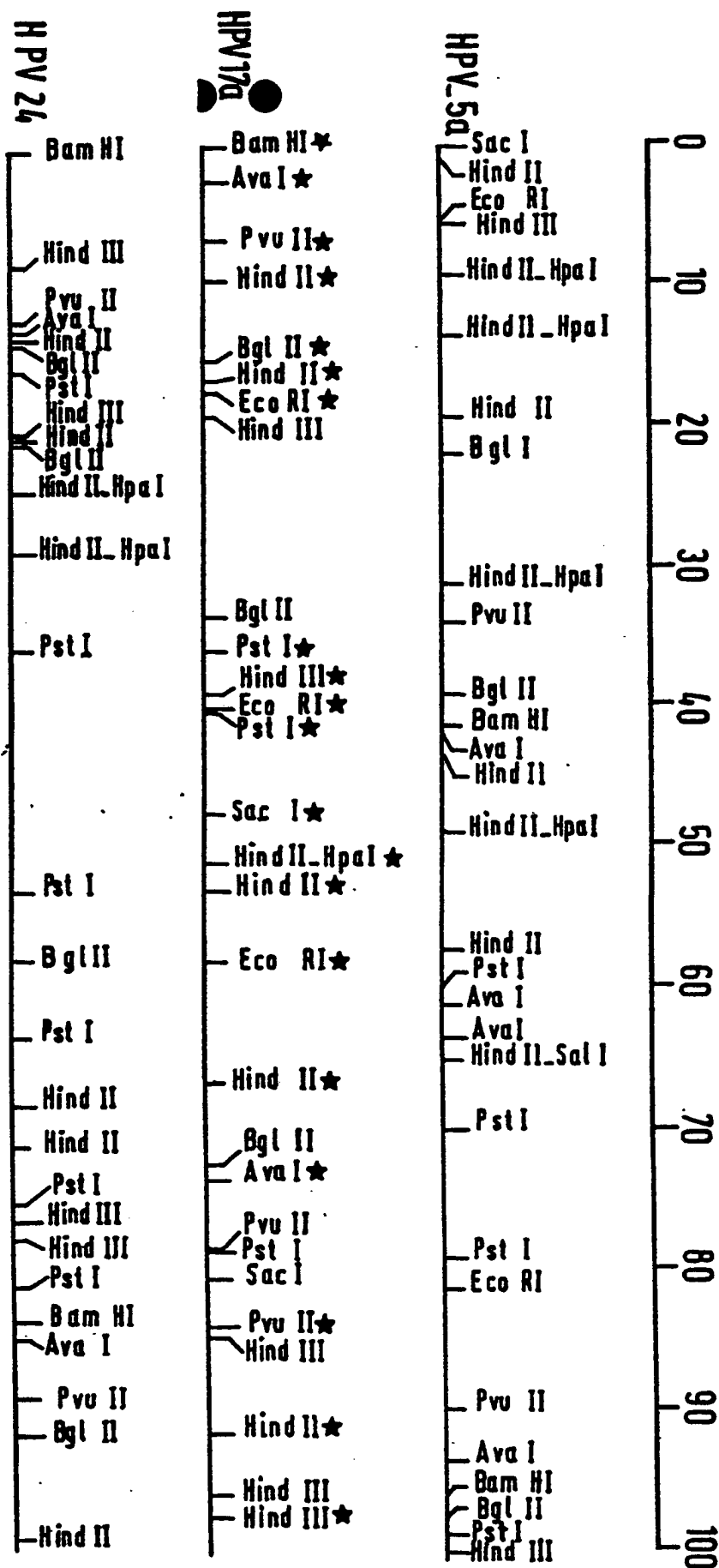
8. Procédé de classification d'un papillomavirus
nouvellement isolé, caractérisé en ce que, après hybri-
5 dation dans des conditions non strictes de son génome
avec la région L2 d'un ou de plusieurs génomes de
papillomavirus connus ou, le cas échéant, séquençage de
son génome, et, par conséquent, repérage du cadre de
lecture ouverte correspondant au gène L2, on produit un
10 recombinant entre un fragment consistant en tout ou
partie de ce gène L2 préalablement excisé dudit génome
et un vecteur approprié, puis on induit l'expression
dudit fragment dans un hôte cellulaire ou microorganisme
approprié, notamment E. coli, on produit, le cas échéant
15 ensuite, in vivo des anticorps contre les produits d'ex-
pression obtenus, on réalise des essais de réaction
croisées antigènes-anticorps entre soit les produits
d'expression des gènes L2 du papillomavirus nouvellement
isolé, soit les anticorps correspondants d'une part, et
20 soit les anticorps, soit les antigènes correspondant à
des papillomavirus de types connus, d'autre part, et
l'on distingue ou non le type de papillomavirus nouvel-
lement isolé de ceux des papillomavirus connus, selon
que les réactions antigène-anticorps croisées conduisent
25 à des résultats négatifs ou positifs.

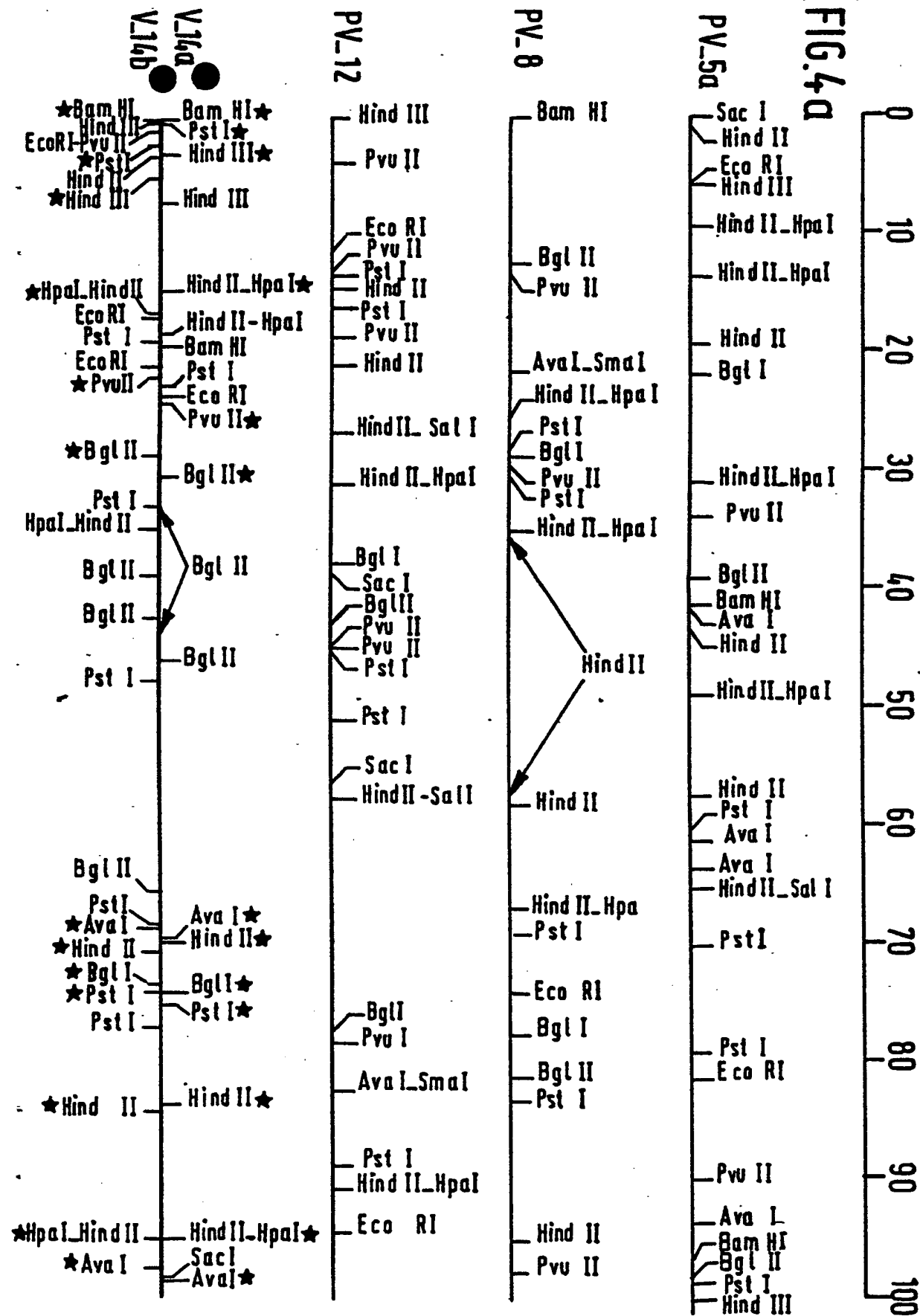
30

35

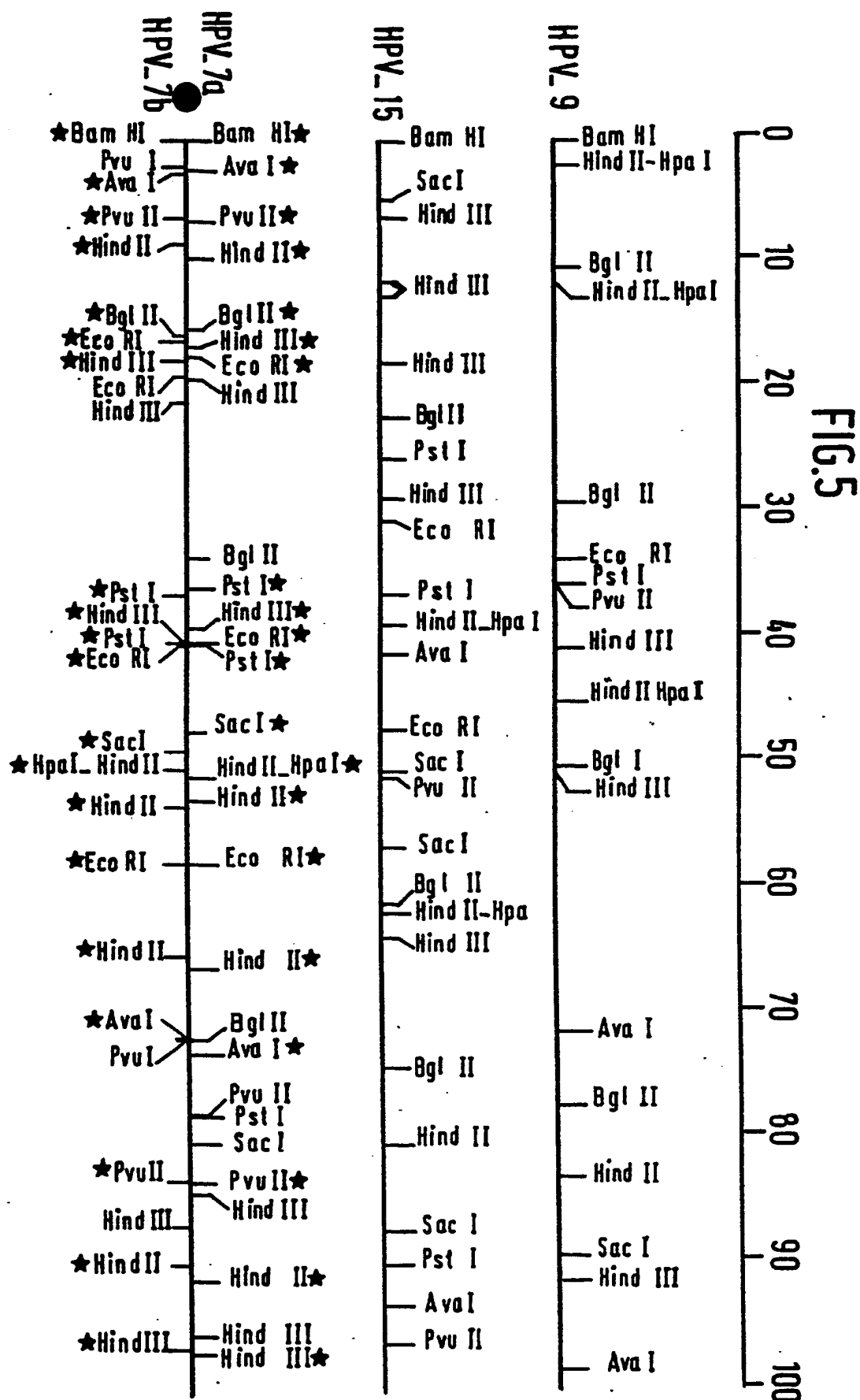












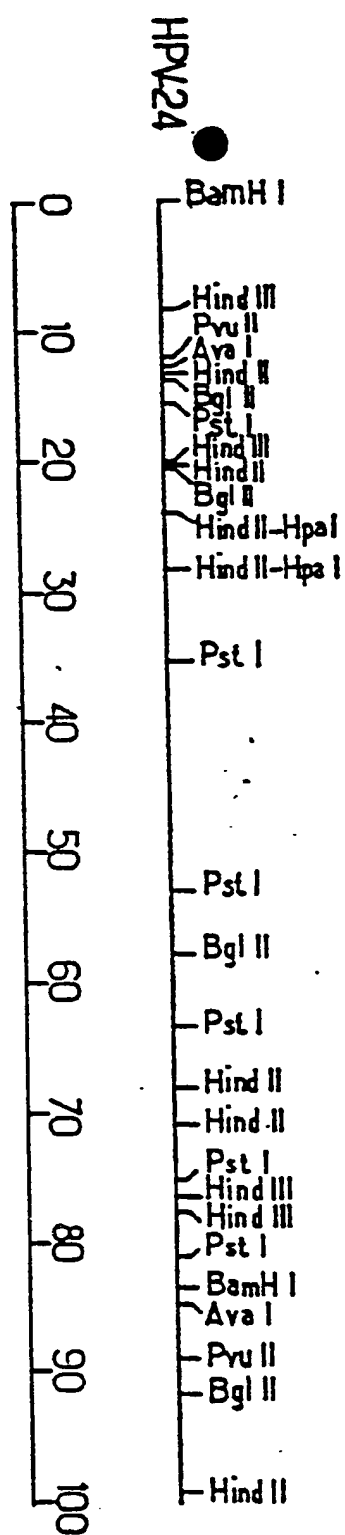
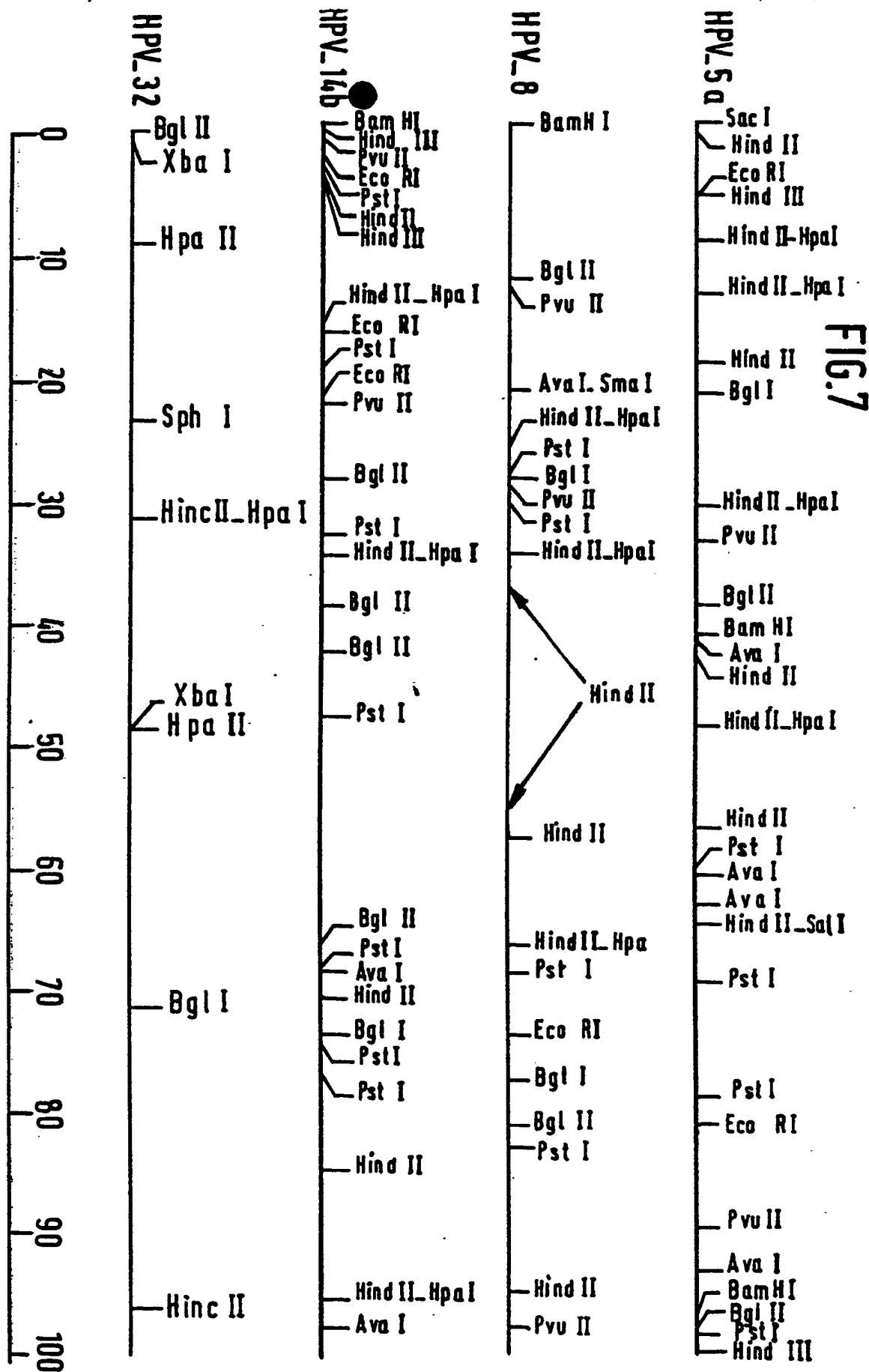


FIG. 6.



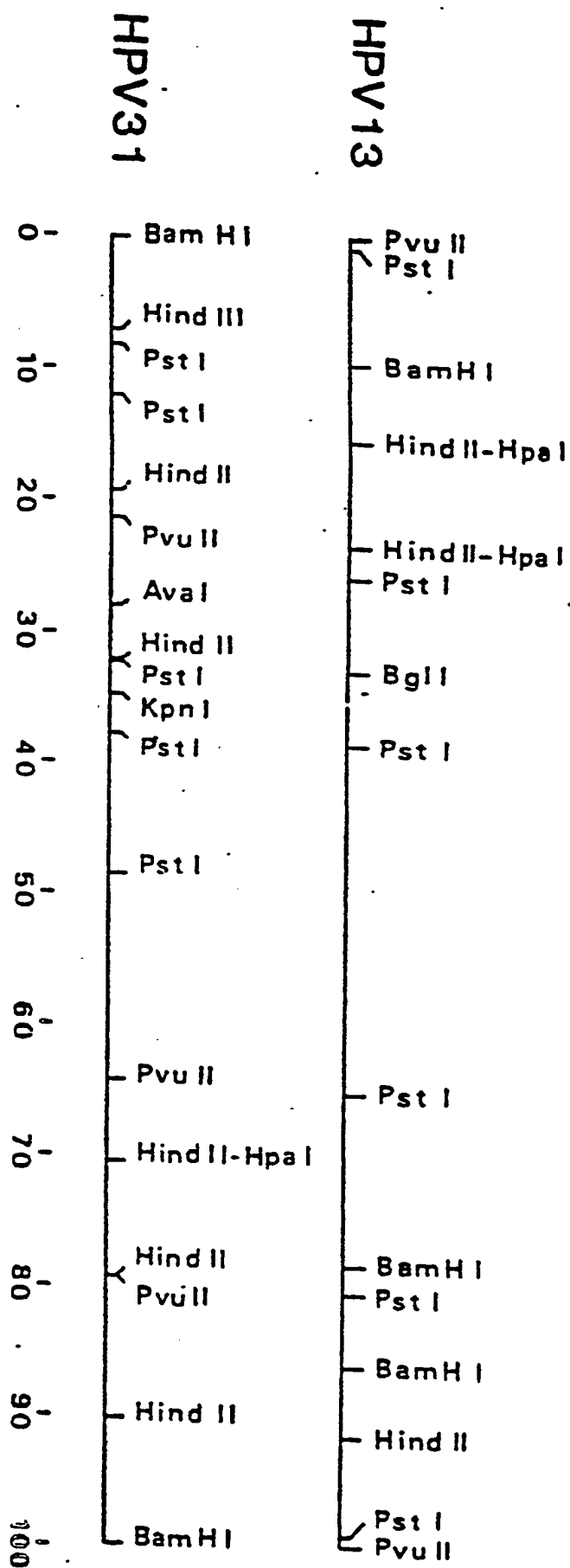


FIG.8.

10/11

HPV-IP 2

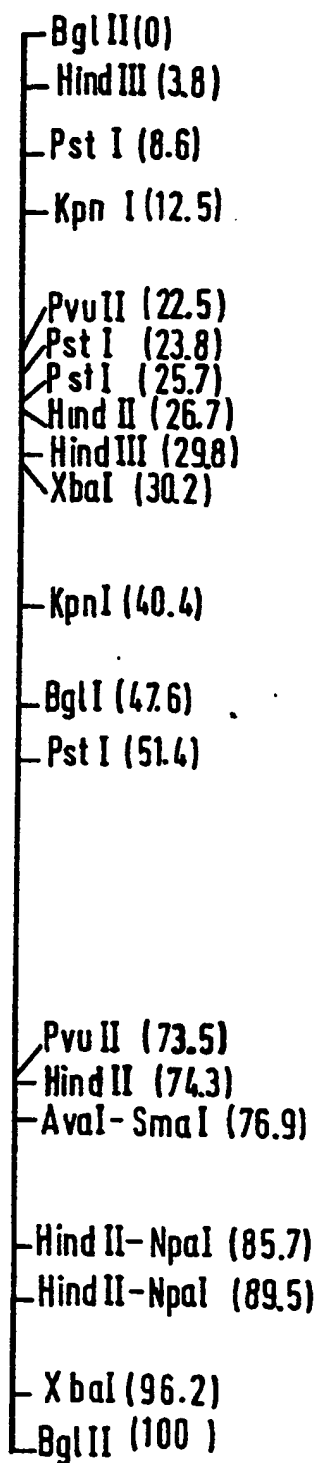


FIG.9

HPV-IP 4

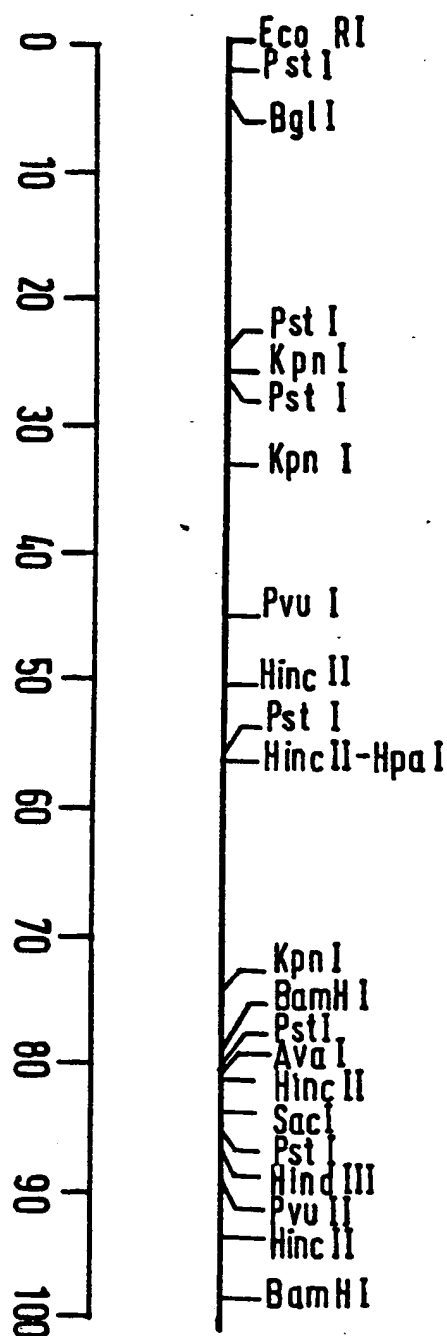


FIG.10

11/11

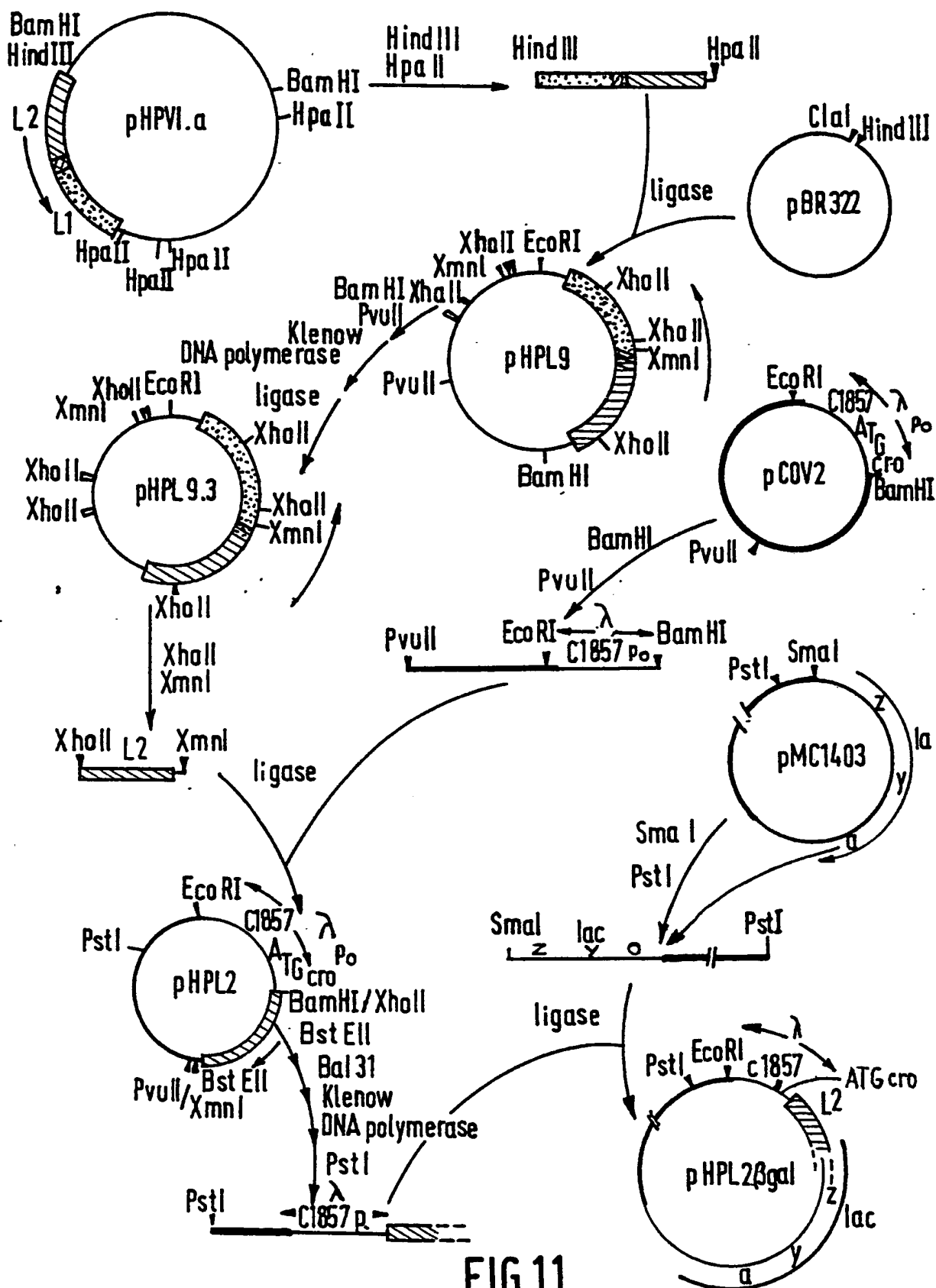


FIG.11

FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/FR 86/ 00288**

I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl.⁴: C 07 K 15/00; A 61 K 39/12; C 12 P 21/00; A 61 K 39/42; G 01 N 33/569; C 12 N 15/00											
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black;">Classification System</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Int.Cl.⁴</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">A 61 K; C 12 N; C 12 Q; G 01 N</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl.⁴	A 61 K; C 12 N; C 12 Q; G 01 N					
Classification System	Classification Symbols										
Int.Cl.⁴	A 61 K; C 12 N; C 12 Q; G 01 N										
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT * <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; border-bottom: 1px solid black;">Category *</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 15%; border-bottom: 1px solid black;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> EP, A, 0133123 (MOLECULAR GENETICS, INC.) 13 February 1985, see page 1, lines 3-21; page 12, line 27 - page 13, line 22; page 17, line 29 - page 18, line 22; page 19, line 31 - page 20, line 17; page 22, line 6, - page 24, line 2; page 24, lines 6-19; page 28, line 25 - page 29, line 32; page 30, lines 5-12; claims 1,2,51,59,60,103-108 . -- </td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-8</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Journal of Virology, volume 52, no. 3, December 1984 American Soc. for Microbiology (US) D. Kremsdorf et al.: "Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papilloma- virus types associated with epidermo- dysplasia verruciformis" pages 1013- 1018, see the whole article -- </td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-8</td> </tr> </table>			Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	Y	EP, A, 0133123 (MOLECULAR GENETICS, INC.) 13 February 1985, see page 1, lines 3-21; page 12, line 27 - page 13, line 22; page 17, line 29 - page 18, line 22; page 19, line 31 - page 20, line 17; page 22, line 6, - page 24, line 2; page 24, lines 6-19; page 28, line 25 - page 29, line 32; page 30, lines 5-12; claims 1,2,51,59,60,103-108 . --	1-8	Y	Journal of Virology, volume 52, no. 3, December 1984 American Soc. for Microbiology (US) D. Kremsdorf et al.: "Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papilloma- virus types associated with epidermo- dysplasia verruciformis" pages 1013- 1018, see the whole article --	1-8
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³									
Y	EP, A, 0133123 (MOLECULAR GENETICS, INC.) 13 February 1985, see page 1, lines 3-21; page 12, line 27 - page 13, line 22; page 17, line 29 - page 18, line 22; page 19, line 31 - page 20, line 17; page 22, line 6, - page 24, line 2; page 24, lines 6-19; page 28, line 25 - page 29, line 32; page 30, lines 5-12; claims 1,2,51,59,60,103-108 . --	1-8									
Y	Journal of Virology, volume 52, no. 3, December 1984 American Soc. for Microbiology (US) D. Kremsdorf et al.: "Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papilloma- virus types associated with epidermo- dysplasia verruciformis" pages 1013- 1018, see the whole article --	1-8									
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> * Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu- ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu- ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family							
* Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu- ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family										
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 13 November 1986 (13.11.86) </td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 12 February 1987 (12.02.87) </td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE </td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 13 November 1986 (13.11.86)	Date of Mailing of this International Search Report 12 February 1987 (12.02.87)	International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer					
Date of the Actual Completion of the International Search 13 November 1986 (13.11.86)	Date of Mailing of this International Search Report 12 February 1987 (12.02.87)										
International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE	Signature of Authorized Officer										

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X,P	Nature, volume 321, 15 May 1986 MacMillan Journals Ltd. Basingstoke (GB) S. Beaudenon et al.: "A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias" pages 246-249, see page 246, right hand column, lines 1-16; page 247, caption to figure 1, 'methods'	8
E	EP, A, 0192001 (INSTITUT PASTEUR ET INSERM) 27 August 1986, see page 2, line 26 - page 3, line 10; page 6, lines 6-18; page 7, lines 9-33; page 15, lines 17-24; page 27, lines 24-28; page 28, lines 1-15; page 31, line 9 - page 32, line 4; claim 8	1-8
A	EP, A, 0092456 (INSTITUT PASTEUR) 26 October 1983, see page 1, lines 1-12; page 2, lines 1-8, 16 - page 3, line 4; page 5, lines 17-33; page 6, lines 13-19; page 12, line 23 - page 13, line 11; claims 1, 8, 10-12 (cited in the application)	1-8
A	J.Gen.Virol., volume 65, (GB) A. Roseto et al.: "Monoclonal antibodies to the major capsid protein of human papillomavirus type I", pages 1319-1324, see page 1319, the whole abstract; page 1323, lines 6-17	3
A	Chemical Abstracts, volume 97, 1982 Columbus, Ohio (US) D. Kremsdorf et al.: "Biochemical characterization of two types of human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis" see page 161, abstract 121331v, & J.Virol. 1982, 43(2), 436-47 (cited in the application)	1-8

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	<p>Journal of Virology, volume 36, no. 2, November 1980, American Soc. for Microbiology (US) C.A. Heilman et al.: "Cloning of human papillomavirus genomic DNAs and analysis of homologous polynucleotide sequences" pages 395-407, see page 395, the whole abstract, right hand column, line 14 - page 396, left hand column, line 4; page 405, left hand column, lines 2-13; page 406, left hand column, lines 9-19 (cited in the application)</p> <p>-----</p>	8